



Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental
Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia – CIBEBI

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA (ECA) E ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) EM
PACIENTES COM TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO/RO

DANIELE SIMÔNE DANTAS DA SILVA

Porto Velho/RO
2013

DANIELE SIMÔNE DANTAS DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA (ECA) E ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) EM
PACIENTES COM TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO/RO

Reitora: Prof. Dra Maria Berenice Alho da Costa Tourinho

Vice-Diretor do NUSAU em exercício da Diretoria: Prof. Dr José Juliano Cedaro

Coordenador do Programa: Prof. Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

S5861a

Silva, Daniele Simône Dantas da

Associação dos polimorfismos da Enzima Conservadora de Angiotensina (ECA) e Enzima Sintetase do óxido Nítrico (ENOS) em pacientes com tuberculose no município de Porto Velho - RO / Daniele Simone Dantas da Silva. Porto Velho, Rondônia, 2014.

134f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rubiani de Cássia Pagotto

1. Susceptibilidade a doenças 2. Polimorfismos genéticos 3. Tuberculose
I. Pagotto, Rubiani de Cássia II. Título.

CDU: 616.24-002.5

Bibliotecária Responsável: Ozelina Saldanha CRB11/947

DANIELE SIMÔNE DANTAS DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA (ECA) E ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) EM
PACIENTES COM TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO/RO

Dissertação apresentada à Fundação Universidade
Federal de Rondônia como requisito para obtenção
do título de Mestre em Biologia Experimental, com
ênfase em Genética. Centro Interdepartamental de
Biologia Experimental e Biotecnologia - CIBEBI,
2013.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rubiani de Cássia Pagotto

Porto Velho/RO
2013

DANIELE SIMÔNE DANTAS DA SILVA

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA ENZIMA CONVERSORA DE
ANGIOTENSINA (ECA) E ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (ENOS) EM
PACIENTES COM TUBERCULOSE NO MUNICÍPIO DE PORTO VELHO/RO

Dissertação apresentada à Fundação Universidade
Federal de Rondônia como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Biologia Experimental, ênfase em
Genética. Centro Interdepartamental de Biologia
Experimental e Biotecnologia - CIBEBI, 2013.

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª Rubiani de Cassia Pagotto
Universidade Federal de Rondônia-UNIR

Assinatura: _____

Profª. Drª. Maria Manuela F. Moura
Universidade Federal de Rondônia-UNIR.

Assinatura: _____

Prof. Drº. Marcelo Custódio Rubira.
Centro de Ensino São Lucas, Faculdade São Lucas

Assinatura: _____

Dedicatória

A todos os pacientes envolvidos neste trabalho, bem como, aos familiares que deram permissão e autorização para que pudessem participar em prol de uma futura melhora nas condições de diagnóstico, exame e tratamento da tuberculose.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus por iluminar meus passos durante esta jornada e ter permitido que eu chegasse até aqui.

A minha mãezinha Maria Marlene, pessoa mais que especial, meu porto seguro e exemplo maior, pelo carinho de sempre, por dividir meus sonhos, e estar sempre acreditando, confiando, apoiando e dando bons exemplos de vida, por ser a pessoa que me acolhe todas as vezes que passo por um momento difícil e por ter me tornado uma pessoa de bem.

A toda minha família, irmãos, sobrinhos, avós, tios (em especial tia Celia e tio Jailton que me ajudaram a comprar meu primeiro notebook indispensável nesse período de mestrado) e a minha madrinha Marlucy pelo auxílio sempre...!

A professora Heloisa Helena que me mostrou o rumo para um mestrado quando eu pensava em fazer uma especialização fora do estado.

A coordenação do programa de pós-graduação em Biologia Experimental na pessoa do professor Luiz Hildebrando Pereira da Silva.

À Dr^a Maria Manuela, diretora geral do CIBEI, pela amizade pelos conselhos e ajuda teórica deste trabalho, por ter cedido às amostras controles bem como apoio físico e estrutural dos laboratórios.

Ao Dr. Ricardo Godoi M. Ferreira, pela disponibilidade e atenção dispensada na parte dos cálculos estatísticos por cobrar de mim o estudo da epidemiologia genética que eu nunca vou esquecer e pelas inúmeras contribuições a este trabalho.

Ao Dr. Marcelo Rubira por ter aceitado ser minha banca de defesa, pelas palavras gentis e pelos ensinamentos valiosos.

A minha querida orientadora (e mãe científica) Dra. Rubiani de Cássia Pagotto, que além de agradecer imensamente, não tenho palavras para descrever o que foram esses anos de aprendizado e prazerosa convivência. Com ela aprendi muito mais do que as teorias e práticas científicas experimentais, será para sempre meu exemplo de vida, de amor à profissão e conceitos morais.

A todos os amigos e colegas do laboratório que me ensinaram e ajudaram a dar os primeiros passos científicos (Maria Helena, Tajiana Costa, Allison Carlos, Marla Helena Har, Horton Martins e Sergio Carlos) e aos bebês da iniciação científica aos quais eu tive o prazer de conviver ensinar e que também me ajudaram com os experimentos (Carol, Charles, Natanael e Najila), independente da convivência diária, que em qualquer momento deixaremos de ter, sempre farão parte de minha vida.

A amiga Marla Helena pela co-orientação nos bastidores, pelas conversas e práticas sempre prazerosas. Estarei te esperando pra iniciarmos o doutorado juntas.

A querida amiga e irmã Dra. Maria Fernanda por ter cedido às amostras controles, pelo apoio moral, incentivo, correção dos textos, quando eu ficava dando voltas para escrever e também por ter suportado todo esse tempo que passei pra terminar o mestrado.

A Dra. Maria Francisca Borro Bijella pela correção dos textos na fase de qualificação e pelas dicas dadas nos bastidores.

A todos os professores pelas lições, aulas, incentivo e bons exemplos.

Aos colaboradores do programa de pós-graduação PGBIOEXP por todo apoio físico e estrutural do programa.

A secretária do programa Caroline, pelo apoio pelas informações e por ser uma pessoa que muito me ajudou durante este tempo de curso.

Ao Sr. Lucio Augusto Baraúna, diretor do posto de saúde Rafael Vaz e Silva que tão prontamente permitiu nosso acesso aos pacientes através das consultas.

A Dra. Lucia de Fátima Batista Carvalho, médica do posto de saúde Rafael Vaz e Silva, por ter aceitado de bom grado nossa presença em suas consultas, pelo incentivo junto aos pacientes e por brindar-nos com o bom exemplo da pessoa maravilhosa e profissional dedicada e amorosa que é.

As enfermeiras Lucia e Nilda pelo auxílio e apoio com os prontuários e informações e pelo bom convívio na fase de coleta.

As diretoras Gecilda e Maria Domingas, (Escola Jorge Teixeira) e Marinete (Escola Tiradentes) como também a todas as supervisoras, professores e colegas que me apoiaram quando precisei me ausentar para cumprir alguma atividade do mestrado.

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e desta grande jornada, meu imenso e sincero... MUITO OBRIGADA!!!

Não existe quem não precise aprender
Nem existe quem não saiba ensinar
Seja humilde para aprender de quem sabe
Seja simples para ensinar quem não sabe
Cada dia se pode aprender muito.

Arnaldo Pandovani

Somos arquitetos de nossa própria estrada e seremos
conhecidos pela influencia que projetamos naqueles que nos
cercam.

André Luiz

SUMÁRIO

RESUMO.....	16
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	18
1.1 HISTÓRICO DA TUBERCULOSE	18
1.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO <i>Micobacterium tuberculosis</i>	20
1.3 CARACTERÍSTICAS DO <i>Micobacterium tuberculosis</i>	20
1.4 TUBERCULOSE: TRANSMISSÃO E SINTOMAS	24
1.5 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	27
1.6 VACINA BCG.....	30
2.0 RADICAIS LIVRES, O ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES	31
3.0 A EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA E A RELAÇÃO TB, eNOS E ECA	35
4.0 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA – SRAA	43
4.1. O GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA – ECA.....	45
4.2 A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA - ECA.....	46
5.0. ÓXIDO NÍTRICO – NO	52
5.1 CARACTERÍSTICAS, SÍNTESE E METABOLISMO.....	50
5.2. O GENE DA ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO E SEUS POLIMORFISMOS.....	55
5.3 ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (eNOS)	55
5.4.A RELAÇÃO ENTRE ECA, eNOS E TUBERCULOSE PODE SER CAUSADA PELOS RADICAIS LIVRES	59
6.0 OBJETIVOS	62
6.1. Geral:	62
6.2. Específicos:.....	62
7. MATERIAIS E MÉTODOS	63

7.1 Desenvolvimento Laboratorial:	63
Descrição das amostras.....	60
Extração do DNA.....	61
Análise dos sistemas genéticos.....	62
Reação em Cadeia de Polimerase.....	62
Genotipagem do polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina - ECA.....	63
Genotipagem dos polimorfismos da eNOS intron 4.....	63
7.2 Análises Genéticas.....	64
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
8.1 Das amostras analisadas.....	65
8.2 O Sistema ECA.....	66
8.3 O Sistema eNOS4	78
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXOS	
1 - DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE	125
2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	126
3 - QUESTIONÁRIO.....	129
4 - APROVAÇÃO DO DIRETOR DO POSTO DE SAÚDE RAFAEL VAZ E SILVA	131
APÊNDICES	
SOLUÇÕES E REAGENTES.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Múmia Egípcia (1.000 anos A. C.) com sinais de TB vertical	18
Figura 2: Selos lançados em campanhas de combate à tuberculose no Brasil	19
Figura 3: Bacilos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
Figura 4: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , coloração de Ziehl-Neelsen, microscópio óptico (aumento 1600x): a) em meio líquido de isolamento, presença de fator corda; e b) em meio sólido de isolamento, presença de fator corda	22
Figura 5: Indivíduo contaminado com o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , destaque para os bacilos nos alvéolos pulmonares e início de infecção	25
Figura 6: Pulmão com tuberculose, evidencia para o centro caseoso formado a partir da morte dos macrófagos.....	26
Figura 7: Esquema da situação epidemiológica da Tuberculose no Brasil.....	29
Figura 8: Marca da vacina BCG em recém-nascido, início de um pequeno processo inflamatório, que irá regredir deixando uma pequena cicatriz sinalizando que a criança está protegida contra tuberculose.	30
Figura 9: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o resultado de suas combinações formando óxido nítrico (NO) e culminando com a formação final de peroxinitrito (ONOO-).	31
Figura 10A: Representação do estresse oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes	33
Figura 11: Atuação do sistema antioxidante e sua interação com o estado de estresse oxidativo.	35
Figura 12: Métodos e estratégias para identificar a susceptibilidade genética humana.	36
Figura 13: Esquema fisiológico do sistema renina-angiotensina-aldosteronada;.....	45
Figura 14a: Esquema da molécula de ECA somática e seu posicionamento na membrana; 14b: ECA solúvel (ou plasmática); 14c: ECA testicular;.....	48
Figura 15: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona ativo, enfatizando a produção de Angiotensinogênio pelo fígado, e a conversão a angiotensina II pela ECA nos pulmões.....	49
Figura 16: Esquema da expressão de eNOS e sua influencia na pressão arterial	53

Figura 17: Cromossomo 7. Localização do polimorfismo de repetição no intron 4, representação dos dois alelos (4 repetições alelo A, 5 repetições alelo B).....	55
Figura 18: Atuação antagônica da ECA e NO sobre o endotélio	57
Figura 19: Gel de Poliacrilamida 8% com amplificações para os alelos ECA*D (190pb) e ECA*I (490pb) e genótipos observados	66
Figura 20: Gel de Poliacrilamida 8% com amplificações para os alelos do Sistema Íntron 4 eNOS*A (390pb) e eNOS*B (420pb) dos pacientes com tuberculose	78

LISTA DE GRÁFICOS QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Inativação de genes do <i>Micobacterium tuberculosis</i> e sua relação com funções estruturais e metabólicas da bactéria.....	37
Tabela 1: Informações genéticas das isoformas NOS humana.....	51
Tabela 2: Apresentação geral dos dados utilizados no presente trabalho, subdivididos por população, média de idade, sexo e número de indivíduos analisados por sistema.....	61
Quadro 2: Sequências de <i>Primers</i> sense e antisense, tamanhos dos produtos amplificados e temperaturas de pareamento utilizados na PCR, especificados por sistema genético.....	62
Tabela 3: Estratificação dos pacientes amostrados segundo os tipos de tuberculose apresentada.....	65
Gráfico 1: Estratificação da amostra de pacientes com tuberculose por sexo e etnia.....	66
Tabela 4: Frequências genotípicas, observadas e esperadas, e frequências alélicas do polimorfismo genético ECA nas amostras populacionais de pacientes com tuberculose e controles da cidade de Porto Velho - RO.	67
Gráfico 2: Comparação das frequências alélicas, ECA*D e ECA*I, observadas em pacientes com tuberculose e amostra controle, na população de Porto Velho - RO	67
Tabela 5: Análise comparativa por tabela de contingência (χ^2 e p) entre frequências alélicas do sistema ECA em pacientes com teste positivo para <i>M. Tuberculosis</i> e população controle, onde N é o número total de alelos amostrados por população.....	68
Tabela 6: Análise comparativa por tabela de contingência (χ^2 e p) entre frequências alélicas do sistema ECA em pacientes com teste positivo para <i>M. Tuberculosis</i> sem outras comorbidades (TB SC) e amostra da população controle “saudável” (controle “s”), onde N é o número total de alelos amostrados por população.....	68
Gráfico 3: Comparação das frequências alélicas ECA*D e ECA*I, observadas em pacientes com tuberculose sem comorbidades (TB SC) e amostra de controle “saudável” (controle “s”), na população de Porto Velho-RO.....	69
Gráfico 4: Comparação entre os intervalos de confiança (95%) para o alelo ECA*D nas amostras populacionais de pacientes com tuberculose, controle (Porto Velho-RO) e população brasileira (média ponderada) para o sistema ECA.....	70
Tabela 7: Frequência (%) dos alelos ECA*D e ECA*I distribuídos por região geográfica dos indivíduos controles de publicações científicas e do presente estudo.....	72

Gráfico 5: Frequências médias ponderadas, por regiões, de ECA*D em populações controles, e respectivos IC (95%) superior e inferior.....	74
Tabela 8: Frequências alélicas ECA*D apresentadas nas populações distribuídas por regiões geográficas	74
Tabela 9: Frequência (%) dos alelos ECA*D e ECA*I distribuídos por regiões geográficas em pacientes com diversas patologias, segundo publicações científicas e do presente estudo.....	77
Tabela 10: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo eNOS4 nas populações de pacientes com Tuberculose e controles saudáveis da cidade de Porto Velho-RO.....	79
Gráfico 6: Comparação das frequências alélicas eNOS4*A e eNOS4*B encontradas em pacientes com tuberculose e controles saudáveis na população de Porto Velho-RO.....	79
Tabela 11: Frequências alélicas do sistema eNOS4 em pacientes com teste positivo para <i>Micobacterium tuberculosis</i> e população controle, onde N é o número total de alelos amostrados por população.....	80
Gráfico 7: Comparação entre os intervalos de confiança (95%) dos pacientes, controles e a população brasileira para o alelo eNOS4*B.....	81
Gráfico 8: Frequências médias ponderadas do alelo eNOS4*A, com IC (95%), a partir de dados obtidos na literatura.....	82
Tabela 12: Frequência (%) dos alelos eNOS4*A e eNOS4*B distribuídos por região geográfica dos indivíduos controles de publicações científicas e do presente estudo.....	83
Tabela 13: Frequência (%) dos alelos eNOS4*A e eNOS4*B distribuídos por região geográfica dos pacientes de publicações científicas e do presente estudo.....	85

LISTA DE SIGLAS

A - Ampere

AIDS – Acquired immune deficiency syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

BK – Bacilo de Koch

CD143 – Outra denominação para ECA

CEP - Conselho de ética em pesquisa

CIBEBI - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia

CO – Monóxido de carbono

DCP1 – Dipeptidyl carboxypeptidase 1

dNTP – Dinucleotídeos trifosfatados

Dp- Desvio padrão

DPOC –Doença Pulmonar Obstrutiva crônica

ECA – Enzima conversora de Angiotensina

EDTA-ácido etilenodiaminotetracético

EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

eNOS – Enzima Sintetase do Óxido Nítrico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IFN γ - Interferon gama

IL - interleucinas

iNOS -

Kb - Quilobases

KDa – QuiloDalton

L.A.M – Lipo-arabino-manano

MboI- *M. bovis* I

MTB- Micobacterium tuberculosis

NaCl - Cloreto de Sódio

NO – Óxido Nítrico

NOS – Sintetase do óxido nítrico

nNOS – Sintetase do óxido nítrico neuronal

NUSAU - Núcleo de Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PA - Isopropanol

PAS - ácido para-amino-salicílico

Pb - pares de bases

PCR- reação em cadeia da polimerase

PPD RT23 – Tuberculin purified protein derivative (Derivado protéico purificado de tuberculina)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PT – Prova tuberculínica

RFA - Resposta de fase aguda

SINAN - Sistema Nacional agravos e notificações

SNPs - Polimorfismo de Base Única

SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

Taq - Enzima de restrição Taq polimerase

TB – Tuberculose

TBE - tampão Tris-EDTA-Borato, pH 8,6

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNF - Fator de necrose tumoral

TRIS- Tris-hidroxometilaminometano

UBS - Unidade Básica de Saúde

V - Volts

VNTR – Números variáveis de repetição in Tandem (*Variable Number Tandem Repeat*)

W - Watts

RESUMO

Fatores genéticos podem influenciar para suscetibilidade a doenças, principalmente quando associados a fatores externos, em pneumopatias o ataque de microorganismos pode contribuir para o mau funcionamento dos pulmões. Muitos estudos ao longo dos últimos 50 anos sugerem que fatores genéticos do hospedeiro influenciam suscetibilidade à tuberculose. Supõe-se que polimorfismos presentes nos genes da ECA e da eNOS podem acarretar problemas específicos e particulares, em vias metabólicas responsáveis pela homeostase de diversas partes do organismo humano, resultando em deficiências genéticas no funcionamento de órgãos, como os pulmões ou em sistemas inteiros como o circulatório. No que se refere à tuberculose, enfermidade parasitária e infecciosa, não se tem conhecimento de trabalhos de associação genética para verificação de uma provável proteção ou susceptibilidade que as enzimas ECA e eNOS, possam promover aos indivíduos portadores dos alelos de seus genes na população de Porto Velho/RO. Neste trabalho procurou-se analisar a ocorrência dos principais alelos da ECA e da eNOS em pacientes com tuberculose pulmonar positiva 88,03% do total de 117 pacientes, através da análise laboratorial de amostras biológicas coletadas com autorização prévia, bem como a avaliação do perfil epidemiológico da doença no município de Porto Velho – RO, através da coleta de dados pessoais e verificação dos prontuários encontrados na Policlínica Rafael Vaz e Silva. A genotipagem molecular para o polimorfismo da ECA nos pacientes (n=91) possibilitou as frequências 0,7747 ECA*D e 0,2253 ECA*I, com $p=0,152$. Enquanto nos controles (n=75) as frequências foram de 0,8200 ECA*D e 0,1800 ECA*I, sendo $p=0,057$, da análise da tabela de contingência obteve-se ($\chi^2=6,29$; gl=2; $p=0,043$), demonstrando que apesar das populações estarem individualmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg existe diferença entre ambas. Ao confrontar as duas amostras através do teste de risco relativo para os portadores do alelo ECA*D, obteve-se um resultado estatisticamente significativo (Risco relativo $X=0,07$; IC_{95%} $0,01<X<0,61$; $p=0,016$) o que pode sugerir que este alelo de alguma forma contribua para proteção contra tuberculose. Em se tratando dos alelos do sistema NOS3 nos pacientes (n=63) foi observada a frequência de 0,8413 eNOS4*B, e 0,1587 eNOS4*A com $p=0,134$, enquanto nos controles (n=37) as frequências encontradas foram de 0,8108 eNOS4*B e 0,1892 eNOS4*A com $p=0,155$ demonstrando que as populações para este sistema também estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg de forma individual. Quando do confronto das duas amostras obteve-se ($\chi^2=1618$; gl=1; $p=0,6875$) de onde se pode inferir que não existem diferenças significativas entre as populações. Quando dos cálculos do risco relativo, (Risco relativo $X=0,76$; IC_{95%} $0,33<X<1,75$; $p=0,5240$) estes não foram estatisticamente significativos, sendo assim não demonstraram nenhuma associação entre os alelos e o risco ou proteção para a tuberculose quanto a este sistema.

Palavras chaves: Suscetibilidade a doenças. Polimorfismos genéticos. Tuberculose.

ABSTRACT

Genetic factors may influence disease susceptibility, especially when associated to external factors, in pneumopathies microorganisms attack may contribute to the malfunction of the lungs. Many studies over the past 50 years suggest that host genetic factors influence susceptibility to tuberculosis. It is assumed that polymorphisms in the genes ACE and eNOS may entail specific and problems in metabolic pathways responsible for homeostasis of various parts of the human body, resulting in genetic deficiencies in the functioning of organs like the lungs or entire systems as circulatory. Regarding to tuberculosis, parasitic and infectious disease, there is no knowledge of papers genetic Association for verification work of a probable protection or susceptibility on ACE and eNOS enzymes, which, can promote to individuals with allele of their genes in the population of Porto Velho/RO. This study sought to analyze the occurrence of the main ACE and eNOS alleles in patients with positive pulmonary tuberculosis 88.03% of the total of 117 patients through the laboratory analysis of biological samples collected with prior authorization, as well as the evaluation of the epidemiological profile of the disease in the municipality of Porto Velho-RO, by collecting personal data and verification of the records found in the Polyclinic Rafael Vaz e Silva. Molecular genotyping for the ACE polymorphism in patients (n = 91) allowed frequencies 0.7747 ACE * D and ACE 0.2253 * I, with $p = 0.152$. While in controls (n = 75) frequencies were ACE 0.8200 * D and ACE 0.1800 * I, $p = 0.057$, contingency table analysis was obtained ($\chi^2 = 6.29$; $gl = 2$; $p = 0.043$), demonstrating that despite people being individually in Hardy-Weinberg equilibrium, there are differences between the two. Comparing two samples by testing risk relative to the ACE allele carriers * D, produced a statistically significant (relative risk result $X = 0.07$; 95% CI $0.01 < X < 0.61$; $p = 0.016$) which may suggest that this allele somehow contributes to protection against tuberculosis. In the case of system NOS3 alleles in patients (n = 63) was observed the frequency of 0.8413 eNOS4 * and * eNOS4 0.1587 with $p = 0.134$, whereas in controls (n = 37) the frequencies found were from 0.8108 eNOS4 * B eNOS4 * 0.1892 and with $p = 0.155$ demonstrating that populations for this system are also in Hardy-Weinberg equilibrium on an individual basis. When confronting of the two samples was obtained ($\chi^2 = 1618$; $gl = 1$; $p = 0.6875$) from where one can infer that there are no significant differences between populations. When estimates of relative risk, (relative risk $X = 0.76$; 95% CI $0.33 < X < 1.75$; $p = 0.5240$) these were not statistically significant, thus not shown no association between alleles and the risk or protection for tuberculosis regarding this system.

Key words: Susceptibility to diseases. Genetic polymorphisms. Tuberculosis

INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO DA TUBERCULOSE

O *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agente etiológico da tuberculose humana, surgiu há cerca de 15.000 anos. O fato de ter sido detectado em múmias egípcias (FIGURA 1) comprova que ele já comprometia o homem 3.400 anos antes de Cristo (CAMPOS, 2006).

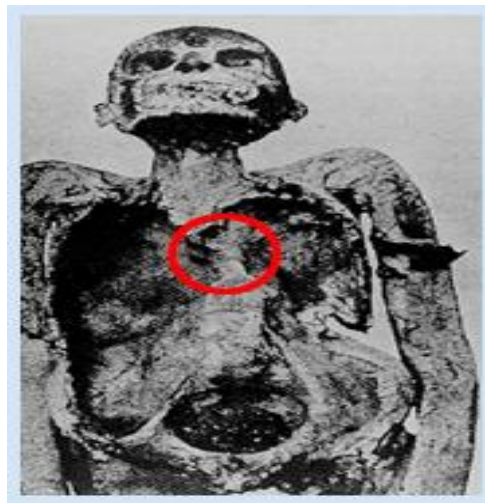


Figura 1: Múmia Egípcia (1.000 anos A.C.) com sinais de TB Vertical.

Fonte: <http://www.fundoglobaltb.org.br/site/tuberculose/historia.php?Section=3&SubSection=2>

A tuberculose humana, também conhecida como peste branca, foi a principal causadora de mortes no final do século XIX e início do século XX. Durante este período, quase 100% da população europeia foi infectada com MTB, sendo que 25% dos casos de óbito ocorreram em adultos (<http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>).

Em toda a história das colonizações, aonde o homem civilizado chegou levou consigo o MTB contaminando os nativos que, sem defesas imunitárias, tiveram grandes contingentes dizimados. Ocorreram episódios semelhantes na colonização dos países da África, Ásia, América, e Polinésia (ROSEMBERG, 2001).

No Brasil a TB foi trazida por alguns colonizadores portugueses e missionários jesuítas, a partir de 1500 (HIJAR, 1994; LEITE e TELAROLLI JR., 1997). Eles contaminaram os índios, na primeira fase da colonização (CAMPOS e PIANTA, 2001). Este fato pode ser confirmado pelas cartas de Inácio de Loyola (1555) e de Anchieta (1583) dirigidas ao reino, onde descrevem: “os índios, ao serem catequisados, adoecem na maior

parte, com escarro, tosse e febre, muitos, cuspidando sangue, a maioria morrendo com deserção das aldeias” (ROSEMBERG, 1999).

Robert Koch, bacteriologista alemão, identificou a bactéria em 24 de março de 1882 como sendo o agente causador da tuberculose, por esse motivo é também denominada “bacilo de Koch” (BK) (BASTA, 2006).

A descoberta do agente causador da TB e o fato da mesma ser uma epidemia em várias cidades e países, praticamente iniciou uma corrida na tentativa de dizimar a doença em várias partes do globo. No Brasil, em 1899, foi criada a Liga Brasileira contra Tuberculose que se propunha a implantar no país os métodos científicos de tratamento e profilaxia em voga no meio médico-social europeu, como campanhas de educação sanitária e implantação de sanatórios (HIJJAR et al., 2007).

Em 1927 ocorreu pela primeira vez a vacinação BCG em recém-nascidos (VERZA, 2008; BARRETO et al., 2006). Entretanto, a esperada redução drástica da taxa de mortalidade ocorreu somente nas décadas de 40 e 50 com o uso da estreptomicina em 1944 (GUIMARÃES et al., 2010; HIJJAR e PROCÓPIO, 2006).

Pela ocorrência dos repetidos episódios de contaminação crescente, o governo brasileiro, na década de 60, lançou campanhas de selos postais com o objetivo de contribuir ao combate da doença (FIGURA 2) (ROSEMBERG, 1999).



Figura 2: Selos lançados em campanhas de combate à tuberculose no Brasil

Fonte: <http://antiguidadecolecoeseartes.blogspot.com/2008/08/combate-tuberculose-filatelias.html>

Em 1980, nova epidemia de tuberculose voltou a aparecer. Desta vez, se destacou como principal doença oportunista devido ao surgimento da AIDS, fato que permanece até os dias de hoje (ARAIS, 2008).

No ano de 1993 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a tuberculose como uma “emergência global”, numa tentativa de aumentar a conscientização pública e política, tendo em vista o aumento da incidência e da mortalidade por uma doença tratável e curável (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 1994; GRANGE e ZUMLA, 2002; HIJJAR et al., 2007).

A partir de 1999 houve uma queda expressiva na incidência de tuberculose no Brasil. Porém, atualmente, o país ainda se encontra entre os 22 responsáveis por 80% dos casos mundiais da patologia considerada a quarta causa de morte por infecção (<http://www.criasaude.com.br/N2810/doencas/tuberculose/estatisticas-tuberculose.html>).

Finalmente, em 2006, no intuito de intensificar o controle da TB, a OMS, por meio do programa “Stop-TB”, lançou o plano global de controle da tuberculose, que propunha o desenvolvimento e avaliação de novos meios e estratégias de controle, diagnóstico e tratamento que possibilitasse de fato a erradicação dessa doença (VENDRAMINI et al., 2006; CASTRO et al., 2011). O referido programa tem sido desenvolvido e constantemente aprimorado até os dias atuais (WHO, 2011).

Após muitos anos, os profissionais de saúde notaram que várias pessoas eram portadoras do MTB, mas não manifestavam os sintomas da doença, funcionando como reservatório do *Micobacterium*, pois o mantinham no organismo em forma latente (ROSEMBERG, 2001).

As tentativas para erradicar esse enorme reservatório de portadores de infecção latente é complicada por vários fatores, incluindo a disponibilidade, o custo e a duração da terapia com a droga necessária para o sucesso do tratamento de tuberculose latente (ROBERTS et al., 2004).

1.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DO *Micobacterium tuberculosis*

O *Micobacterium tuberculosis*, pertence ao Reino Monera, Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae, Gênero *Mycobacterium* e Espécie *M. tuberculosis* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/1773>).

O gênero ao qual pertence o *M. tuberculosis* compreende mais de 100 espécies, sendo a maioria saprófitos de vida livre (ARANAZ, 1999). Deste total, mais de 30 espécies são capazes de causar doença no ser humano (LIMA et al., 2011).

As espécies do complexo *M. tuberculosis* causam a tuberculose no homem e/ou animais (HADAD et al., 2005). Esse complexo é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, principal agente da tuberculose humana; *M. bovis*, principal agente da tuberculose bovina; *M. bovis-BCG*, *M. africanum*, agente da tuberculose humana encontrado mais frequentemente na África e *M. microti* que causa tuberculose em roedores (ABRAHÃO, 1998).

Recentemente, foram incluídos neste complexo *M. bovis subsp caprae*, causador de tuberculose em caprinos (NIEMANN et al., 2002) e *M. pinnipedii* que causa tuberculose em leões marinhos e no homem (COUSINS et al., 2003). O "*M. canettii*", uma variante de *M. tuberculosis* encontrada na região da Somália, ainda não foi oficialmente reconhecido como uma espécie do complexo (EUZÉBY, 2005).

1.3 CARACTERÍSTICAS DO *Micobacterium tuberculosis*

De uma forma geral o *M. tuberculosis* (FIGURA 3) é uma bactéria estritamente aeróbia, sendo facilmente encontrada nos lobos superiores dos pulmões em casos de tuberculose (MASCHMANN, 2008).

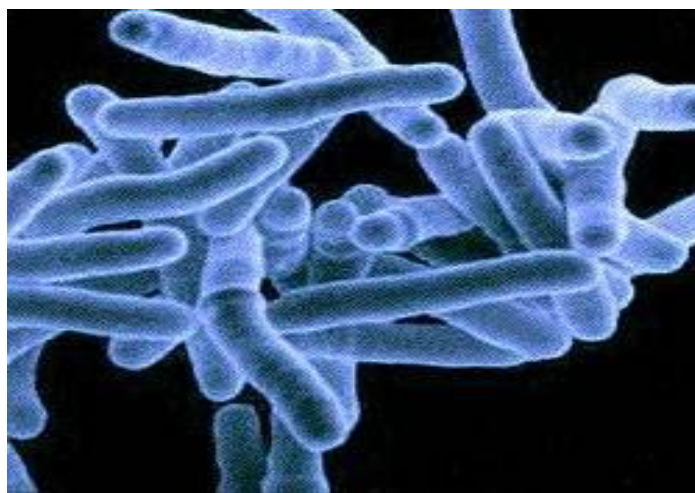


Figura 3: Bacilos de *Micobacterium tuberculosis*.
Fonte: <http://www.raw-milk-facts.com/tuberculosis.html>

É considerado um parasita intracelular facultativo, se multiplica dentro dos macrófagos, atuando por vezes como agente de infecções crônicas granulomatosas (VANLUME, 2008; BEHAR et al., 2010). Porém, possui a capacidade de residir em seu hospedeiro humano durante décadas sem causar sintomas clínicos (HONAKER et al., 2009).

O crescimento do MTB é bastante lento em relação às outras bactérias¹ (14 a 20 horas em meio de cultura e 25 a 32 horas nos macrófagos), estima-se um tempo de 4 a 6 semanas para obtenção de uma população densa, característica fisiológica que pode contribuir para sua virulência (AVAD, 2010).

Esta bactéria pode ser cultivada em dois meios: o Middlebrook MTB (ágar base), e o meio Lowenstein-Jensen, baseado em ovo (SABADINI, 2009). As colônias de MTB caracterizam-se por serem pequenas e por apresentarem o “fator corda serpentina” (FIGURA 4), nas quais os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) estão dispostos em cadeias paralelas (LEVINSON & JAWETZ, 2005). As colônias levam de 4 a 6 semanas para tornarem-se visíveis. Ambos os tipos de meios contêm inibidores que mantêm os contaminantes fora do crescimento dos *Micobacterium* e estão relacionados ao poder de virulência da bactéria (GOMES, 2011).

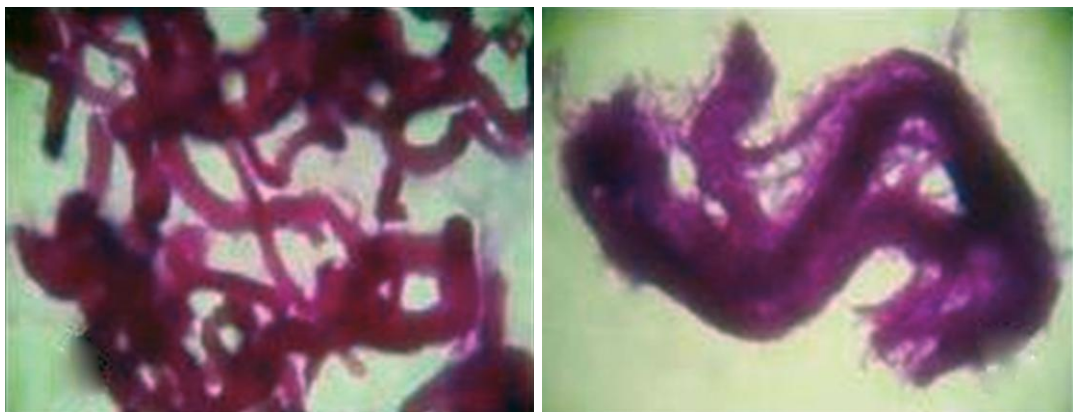


Figura 4: *Mycobacterium tuberculosis*, coloração de Ziehl-Neelsen, microscópio óptico (aumento 1600×): a) em meio líquido de isolamento, presença de fator corda; e b) em meio sólido de isolamento, presença de fator corda.

Fonte: COELHO et al., 2007;

O *M.tuberculosis* caracteriza-se por apresentar morfologia reta, bacilar ou cocobacilar, ligeiramente curva, imóvel, não esporulada, não encapsulada, medindo de 1 a 10 micrometros

¹ A bactéria *E.coli* pode dividir-se a cada 20 minutos aproximadamente (GOMES, MC).

de comprimento por 0,2 a 0,6 micrometros de largura (CAMPOS, 2006), além de não produzir toxinas. Seu crescimento se dá em temperaturas de 37°C, com pH variável de 7,0 a 7,2, são hidrofóbicos e tendem a crescer formando agregados, filamentos ou ramificações (SHINNICK, KING et al., 1995; MADINGAN, 2000).

O envelope celular é complexo e serve de proteção à ação de agentes químicos, mas pode sofrer a ação de agentes físicos, como calor, luz solar e radiação ultravioleta. Fora do parasitismo, o bacilo só consegue sobreviver no meio externo por algumas horas (BRENNAN e NIKAIDO, 1995; METCHOCK et al., 1999)

A estrutura da parede celular micobacteriana é bastante singular devido a presença de um peptideoglicano que contém ácido N-glicolilmurâmico, no lugar do ácido N-acetilmurâmico, o qual é comumente encontrado na maioria de outras bactérias (BRITO, 2008). Esta parede apresenta cerca de 60% de sua estrutura composta por lipídeos, os ácidos micólicos (consistindo de ácidos graxos de cadeia longa, com 60 a 90 átomos de carbono), que por sua vez estão ligados covalentemente ao polissacarídeo da parede celular, denominado arabinogalactano, unido ao peptideoglicano por pontes fosfodiéster (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

O Alto teor de lipídeos presente na parede celular das micobactérias, cerca de 60%, confere a estes microorganismos características como a formação de película em meios líquidos, resistência a descoloração por álcool-ácido, a diversos agentes químicos e a antibióticos (MANZANO et al., 2005).

A parede celular também contem alguns tipos de lipídios livres, não covalentemente associados a este esqueleto basal (o complexo arabinogalactano-peptideoglicano), e algumas proteínas (SCHROEDER, 2004). Estes lipídios representam epitopos passíveis de reconhecimento pelo hospedeiro (SMITH, 2003).

É esta parede singular que permite a sobrevivência do microorganismo dentro dos macrófagos, que normalmente aniquilam patógenos fagocitados (BEGON et al., 2006; WELIN, 2011). Facilita, também, a agregação bacteriana, tornando ainda mais árduo o cultivo deste patógeno e a realização de contagens, além de dificultar seu diagnóstico (MACHADO, 2010). As micobactérias são relativamente resistentes à dessecação, a álcali e a muitos desinfetantes químicos, o que dificulta a prevenção da sua transmissão em instituições e meios urbanos em geral (MONTEIRO et al., 2009).

O MTB não pode ser caracterizado verdadeiramente como bacilo gram-positivo ou gram negativo, pois, apesar de ter o peptidoglicano N-glicolilmurâmico em sua parede celular (LEVY-FRÉBAUT & PORTAELS, 1992), fica impossibilitado de se corar devido a presença de cerídeos e lipídios complexos como: ácidos micólicos e glicolipídios que impossibilitam sua coloração pela técnica de Gram, sendo por isso, denominados bacilos álcool ácido resistentes e tornando a técnica de Ziehl-Neelsen a única utilizada para sua coloração (COELHO & MARQUES, 2006). Outro componente importante são os dimicolatos de trealose e os sulfolipídios, participantes do processo de virulência. Já o lipo-arabino-manano (L. A. M.) é um constituinte único que pode causar prejuízos ao hospedeiro (VALENZUELA, M. 2000).

O *M. tuberculosis* tem um misterioso mecanismo de latência que é utilizado para escapar de situações ou ambientes hostis. Kumar et al (2007) fizeram experimentos em ratos, identificando genes ligados ao sistema “Dos” relacionados a esse mecanismo. Descobriram que a latência é modulada na presença de O₂, CO e NO, como também em condições de hipóxia. Ainda demonstraram que este sistema é um forte indicio de evolução da persistência dos bacilos.

Além de todas as características acima citadas, o complexo *M. tuberculosis* pode ser diferenciado das outras micobactérias pela presença de sequências genéticas como as inserções IS6110, IS1081 e *mpb* 70, como também pela ausência de: pigmentação das colônias, por crescer na presença de 500g/ml p-nitrobenzoato (PNB), em concentração de 5% cloreto de sódio, a 45°C, com catalase termoestável e arilsulfatase (COELHO & MARQUES, 2006).

1.4 TUBERCULOSE: TRANSMISSÃO E SINTOMAS

A tuberculose pulmonar caracteriza-se como uma doença crônica, infectocontagiosa, transmitida a pessoas saudáveis quando estas inalam perdigotos (partículas de 1 a 5 µm de diâmetro)² originados na tosse, espirros, fala e risada de portadores da mesma (FIGURA 5).

² Somente gotículas menores (1 a 5 micrometros de diâmetro) contendo de 1 a 3 bacilos alcançam os alvéolos, pois as gotículas maiores ficam retidas nas vias aéreas superiores e são removidas por um mecanismo de limpeza mucociliar.

Essas bactérias permanecem em suspensão no ar durante horas (LIMA et al., 2011). Pode ainda ser transmitida por duas vias mais raras, o trauma cutâneo e a ingestão de alimentos (OLIVEIRA, 2008).

Quando uma pessoa inala as gotículas contendo os bacilos de Koch, muitas delas ficam no trato respiratório superior (garganta e nariz), onde a infecção é improvável de acontecer. Contudo, quando os bacilos atingem os alvéolos a infecção pode se iniciar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Ao atingir tal região, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, permitindo que o organismo do contaminado possa responder de duas maneiras:



Figura 5: Indivíduo contaminado com o *Mycobacterium tuberculosis*, destaque para os bacilos nos alvéolos pulmonares e início de infecção.

Fonte: <http://www.jornallivre.com.br/157643/tipos-de-afeccoes-do-pulmao.html>

No primeiro caso, se o sistema imunológico do contaminado estiver atuante, este pode adquirir resistência natural à infecção bacteriana, através da destruição completa dos microrganismos pelos fagócitos, sem nenhuma sequela para si (OLIVEIRA e FILHO, 2000).

No segundo caso, as bactérias podem sobreviver dentro dos fagócitos, pois possuem glicopeptídeos fenólicos em sua parede celular. Estes glicopeptídeos fenólicos servem para remover os radicais hidroxilas (ânions superóxidos) produzidos pelos fagócitos com o objetivo de eliminar agentes intrusos. Em consequência os macrófagos morrem e libertam os bacilos formando um centro caseoso (FIGURA 6), o tubérculo ou granuloma, caracterizando a “lesão da primo-infecção de tuberculose” (SCHLUGER e ROM., 1998; DANNENBERG, 1994).

Uma vez que ocorra uma resposta do sistema imunológico, o bacilo poderá sofrer uma disseminação hematógea, permanecendo vivo nos tecidos, mas não podendo se multiplicar, uma vez que o ambiente caseoso não é propício para isso, culminando com o “estado latente da tuberculose” que funcionará como reservatório para reativação da doença (SCHLUGER e ROM., 1998; PARK et al., 2003; KENDALL et al., 2004)



Figura 6: Pulmão com tuberculose evidencia para o centro caseoso formado a partir da morte dos macrófagos.

Fonte: <http://www.aloelive.com.br/Blog/tuberculose-e-seus-sintomas-retornam-com-forca-total/#more-3124>

Em 10%³ dos casos, a tuberculose latente pode modificar-se quando da baixa imunidade do indivíduo (VOSKUIL et al., 2003). Desse modo ocorre que o centro do tubérculo pode liquefazer-se dando origem a cavidades cheias de ar, nas quais os bacilos se multiplicam de forma extracelular. O enchimento das cavidades pode levar ao rompimento do tubérculo e a ocorrência do espalhamento dos bacilos nos bronquíolos, deste para todo o pulmão e conseqüentemente para outros órgãos, como rins, intestino delgado, ossos, olhos e órgãos genitais (FUNASA, 2002).

A TB é considerada uma doença de desenvolvimento lento, com período de incubação variando de 4 a 12 semanas (SOUZA, 2009), a partir do qual o indivíduo contaminado passa a apresentar sintomas como mal estar, palidez, dor no peito, falta de apetite, perda de peso, febre, sudorese noturna, fadiga, tosse crônica por mais de 21 dias e, após esse prazo, tosse com expectoração de pus e sangue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

³ 10% é valor estabelecido para pessoas HIV negativo, para os indivíduos positivos o risco é de 15%.

1.5 DADOS EPIDEMIOLOGICOS

A tuberculose é a principal causa infecciosa de mortalidade no mundo, sendo comparada somente a do vírus da imunodeficiência humana (HIV), (BERRINGTON e HAWN, 2007).

O *MTB* causa aproximadamente dois milhões de morte anualmente. Estudos estimam que um terço da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis* na forma latente (KUMAR et al., 2008) e aproximadamente 10% destas infecções serão reativadas para uma doença aguda (HONAKER, et al, 2009). Destas, metade serão desenvolvidas nos primeiros anos após o contágio e formação do complexo primário, e os demais (5%) ao longo de suas vidas, quando apresentarem alguma forma de imunodepressão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; WHO, 2004).

Os números acima podem ser explicados, em parte, pela capacidade da bactéria persistir no interior de macrófagos, em um ambiente extremamente agressivo, onde é exposta a diferentes moléculas antimicrobianas tais como as espécies reativas de oxigénio (FLANNAGAN et al., 2009). Estas, sendo altamente reativas, causam danos em todo o tipo de moléculas incluindo lipídios, proteínas e DNA. Desta forma, os mecanismos de defesa utilizados pelo *M. tuberculosis* contra as espécies reativas de oxigénio são sem dúvida, importantes, porém, o seu papel na virulência e patogênese desta bactéria ainda é pouco conhecido (MESTRE, 2012).

A infecção para se tornar doença sintomática depende do agente, das fontes de infecção, dos hospedeiros estarem suscetíveis e das condições para a transmissão (AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2006), sugerindo diferenças na susceptibilidade para sua progressão (SKAMENE et al., 1998). A susceptibilidade genética pode desempenhar um papel importante em determinar que os indivíduos infectados desenvolvam a tuberculose ativa (VELEZ et al., 2009).

O acometimento da tuberculose ocorre principalmente nos pulmões, devido a grande oferta de oxigênio (LIMA, 2011). Porém, apesar da dependência do oxigênio, o bacilo pode se disseminar por todo o organismo do hospedeiro, atingindo os sistemas geniturinário, nervoso central, osteoarticular, ganglionar, gastrointestinal, dentre outros (LOPES et al., 2006).

Os potenciais transmissores da TB são as pessoas que tosse e que têm BAAR positivo no exame de escarro, os doentes de TB pulmonar sem tratamento, os pacientes que recém iniciaram a terapia específica ou os casos com pobre resposta ao tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Na TB pulmonar, após 15 dias de tratamento, a tosse diminui bastante e o risco de contágio cai de maneira significativa (PICCON, 1993).

A ocorrência da TB em países desenvolvidos ou de economias emergentes, se dá especialmente pela influência de associação desta enfermidade com a presença do HIV, expondo contrastes profundos de desenvolvimento, uma vez que tal patologia está associada a indicadores de pobreza. Por tal razão o controle desta enfermidade destaca-se na agenda de prioridades dos países em desenvolvimento (HIJJAR et al., 2001; COELHO et al., 2007). A propagação está intimamente ligada às condições de vida da população, proliferando em áreas de grande concentração humana, onde a infraestrutura urbana tem serviços precários, como saneamento e habitação, e coexistem a fome e a miséria (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Sua disseminação pode atingir todos os grupos etários, embora cerca de 85% dos casos ocorram em adultos e 90% em sua forma pulmonar (TORTORA et al., 2007).

A atual epidemia de tuberculose está sendo sustentada e alimentada por dois fatores importantes: a infecção pelo HIV e sua associação com tuberculose ativa e o aumento da resistência de *M. tuberculosis* a drogas anti-TB (WHO, 2011).

A infecção pelo HIV está associada com um risco aumentado de desenvolvimento da tuberculose extrapulmonar. Este risco aumenta à medida que a contagem dos linfócitos CD4+ diminui (SHARMA et al., 2004; GOPINATH et al., 2008).

A tuberculose extrapulmonar é possivelmente um marcador de compromisso imunitário subjacente. Este tipo de tuberculose é mais comum em crianças do que em adultos, provavelmente devido ao sistema imunológico infantil ser ainda imaturo nesta fase (STERLING et al., 2001). Mesmo não oferecendo risco a saúde pública, a TB extrapulmonar é muito frequente no mundo, respondendo por grandes porcentagens tanto na Europa (15,1%) como em países da África (como a Somália, com 58,9%), e a Ásia (44%) (TE BEEK et al., 2006). Dos diversos tipos de TB extrapulmonar, os mais comuns foram nos linfonodos (35%) e os menos frequentes foram representados por cérebro-espinhal, abdominal e rins com 26% dos casos (SHARMA et al., 2004).

De acordo com estimativas da OMS, somente em 2009, 9,4 milhões de novos casos de tuberculose foram registrados no mundo, com 1,3 milhões de óbitos (WHO, 2011). No ano de

2010, foi estimado um incidente de 8,8 milhões de casos de TB global (variação de 8,5 a 9,2 milhões). A maioria do número de casos estimados neste ano ocorreu na Ásia (59%) e África (26%). A Índia respondeu sozinha por um quarto do valor estimado representando (26%) dos casos de tuberculose em todo mundo (SANKAR et al., 2012).

Nas Américas, o Brasil é o país que mais notifica casos. O número de casos novos está próximo dos 100.000/ano (TEIXEIRA et al, 2007), e aproximadamente 15 mil casos de recidiva ou reingresso após abandono de tratamento. Brasil e Peru contribuem com 50% de todos os casos da América latina (HIJJAR e PROCÓPIO, 2006).

No Brasil. A taxa de incidência na região sul e centro-oeste é de aproximadamente 30 casos/100.000 habitantes, já nas regiões norte, nordeste e sudeste essa taxa sobe para aproximadamente 50 casos/100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Existe uma grande preocupação com relação à incidência da tuberculose bacilífera no grupo etário de 15 a 29 anos (FIGURA 7), pois tende a refletir melhor a verdadeira situação da tuberculose em um país, uma vez que traduz a ocorrência de casos derivados de infecções recentes (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008).

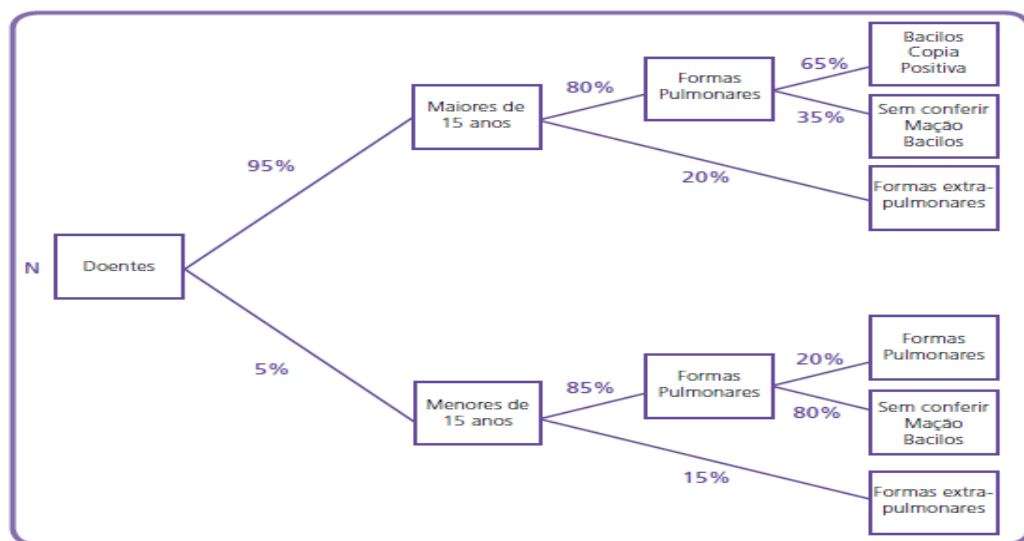


Figura 7: Esquema da situação epidemiológica da Tuberculose no Brasil.
Fonte: Ministério da saúde, 2002.

Em presídios há um alto índice de tuberculose. Esta maior incidência de tuberculose entre os presos do que na população é explicada pelos hábitos dos detentos e às condições estruturais do local que terminam por expor os detentos a fatores de alto risco, como desnutrição, higiene escassa e inadequadas condições de vida (SÁNCHEZ, 2007). Outros

fatores agravantes para a transmissão da doença são a superlotação, a pouca ventilação, condições sanitárias adversas, e o baixo nível econômico, além do uso de drogas (ZIMMERMANN et al., 2009). A taxa de incidência de TB em prisões do estado do Rio de Janeiro, no ano de 2004, foi trinta vezes superior a assinalada, no mesmo ano, para a população geral daquele Estado (SÁNCHEZ, 2007).

1.6 A VACINA BCG

A vacina contra tuberculose recebeu este nome devido aos estudos de seus criadores Albert Calmette e Camile Guérin, cientistas do Instituto Pasteur (França) que obtiveram, em 1921, uma cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, o qual denominaram BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), constituindo a primeira vacina contra este mal, que é utilizada até hoje para imunizar crianças nas primeiras fases de vida (FIGURA 8) (MARCH, 2002). No Brasil sua obrigatoriedade ocorreu na década de 60, quando a incidência de doença caiu consideravelmente (HIJJAR et al., 2007).

Esta vacina também desencadeia reação tuberculínica, que tende a ser menor em enduração e menos duradoura, tornando-se geralmente negativa após cinco primeiros anos de vacinação (DIMANTAS et al., 2003).



Figura 8: Marca da vacina BCG em recém-nascido, início de um pequeno processo inflamatório, que irá regredir deixando uma pequena cicatriz sinalizando que a criança está protegida contra tuberculose.

Fonte: <http://manualdamama.blogspot.com.br/2012/07/e-quando-bcg-nao-inflama.html>

2.0. RADICAIS LIVRES, O ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

Uma característica fundamental dos radicais livres, também denominados, ERMO (“espécies reativas do metabolismo do oxigênio”), EROs (“espécies reativas do oxigênio”) e ERNs (“espécies reativas do nitrogênio”) é possuírem um ou mais elétrons desemparelhados que se encontram centrados nos átomos de oxigênio e nitrogênio (VISIOLI et al., 2000; FINKELL, 2000). Estes radicais são produtos da grande taxa metabólica ocorrente nos seres vivos, e atuam num processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas importantes, como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (SILVA & CERCHIARO, 2011).

As ERMOs são formadas no organismo humano a partir das reações de oxirredução, ou como subprodutos decorrentes de outros tipos de reações metabólicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Porém, o resultado de seu excesso no organismo acarreta efeitos prejudiciais, tais como a lipoperoxidação de membranas e oxidação de proteínas (HUSAIN et al., 1987).

Os EROs e ERNs (FIGURA 9) incluem os radicais livres que são divididos em dois grupos: as EROs radiculares: hidroxila ($\text{HO}\bullet$), superóxido ($\text{O}_2\bullet^-$), peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e alcóxila ($\text{RO}\bullet$); e as EROs não radiculares: oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (DROGE, 2002). No grupo das ERNs podemos encontrar o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito (ONOO^-) (BARREIROS et al., 2006).

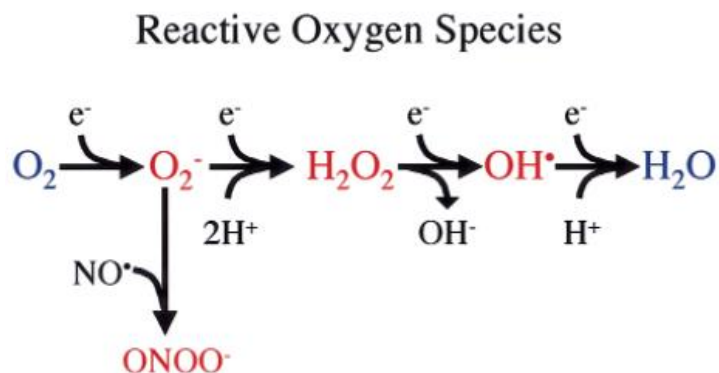


Figura 9: Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e o resultado de suas combinações formando óxido nítrico (NO) culminando com a formação final de peroxinitrito (ONOO^-);
Fonte: Adaptado de BOWLER & CRAPO, 2002.

As EROs são produzidas continuamente na cadeia respiratória das mitocôndrias com a redução de um elétron do oxigênio molecular (STEINBRENNER, 2009). NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, cicloxigenase e lipoxigenase são grandes fontes enzimáticas destes radicais em células de mamíferos, enquanto a radiação UV representa um exemplo de um fator ambiental de geração de EROs (BOLIN, 2012).

O radical livre óxido nítrico (NO), idêntico ao fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE), é uma importante molécula citotóxica que atua na defesa contra parasitas, como fungos, protozoários e bactérias, resultando na vasodilatação e inflamação (VALANCE & MONCADA, 1994).

Nos processos infecciosos, os macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam NO e alguns intermediários reativos do oxigênio simultaneamente. A reação do NO com os intermediários do oxigênio consiste na ação citotóxica indireta deste radical (DUSSE et al., 2003). O NO participa de uma ação tóxica cooperativa com o ânion superóxido (O_2^-), culminando com a formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). Este, por sua vez, pode adquirir prótons na presença de íons hidrogênio (H^+), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil (HO^\bullet), que acarreta no aumento efetivo da ação tóxica do NO e do O_2^- (BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

O estresse oxidativo pode ser definido como um aumento da exposição a oxidantes, ou a diminuição das capacidades antioxidantes, sendo amplamente reconhecido como um aspecto central de muitas doenças (HEFFNER & REPINE, 1989; HALLIWELL, 1996).

A ocorrência do estresse oxidativo se dá devido um aumento significativo na produção de radicais livres, ocasionando danos celulares (CUNHA, 2008). Este processo é definido como uma sobrecarga de espécies reativas de oxigênio que causam prejuízos à estrutura das biomoléculas de DNA, carboidratos, lipídios e proteínas, além de outros componentes celulares (CHIARANI, 2008).

Os radicais livres medeiam a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia) por meio da cadeia transportadora de elétrons, fertilização do óvulo, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante os processos de infecção (SHAMI & MOREIRA, 2004). No entanto, sua produção excessiva pode conduzir a danos significativos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A geração de radicais livres também ocorre nos fagócitos quando infectados por bactérias ou vírus, produzindo oxidantes como o óxido nítrico, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, entre outros, que fazem com que os radicais livres sejam parte da defesa imune do organismo (LEITE & SARNI, 2003; VALKO et al., 2006).

O estresse oxidativo é decorrente da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (FIGURA 10) em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses (BARBOSA et al., 2010).

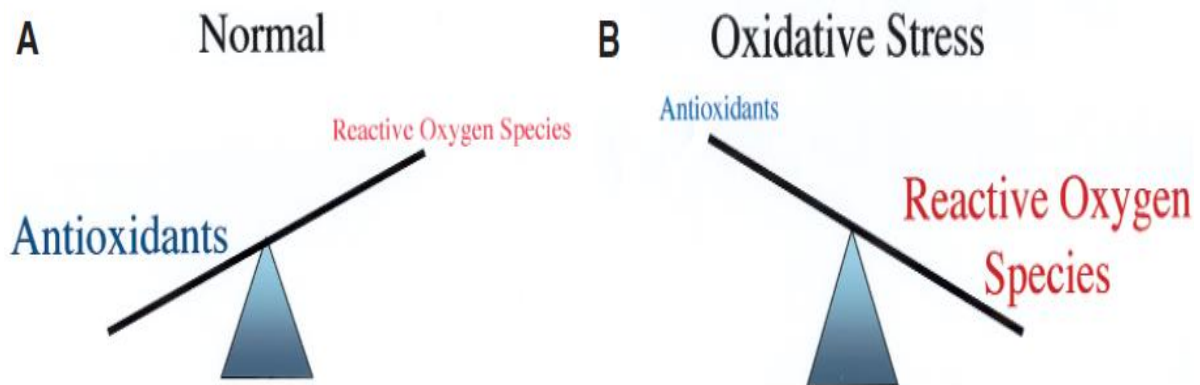


Figura 10: A – Representação do estresse oxidativo gerado pelo desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes. B – Quando a produção de qualquer antioxidante é diminuída, ou a produção de espécies reativas de oxigênio é aumentada (doença respiratória), o equilíbrio é desfeito ocasionando o estresse oxidativo;

Fonte: Adaptado de BOWLER & CRAPO, 2002;

Este processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Devido a este fato, o estresse oxidativo tem sido relacionado na patogênese de diversas doenças, que variam de cardiovasculares, neurodegenerativas, a alguns tipos de câncer, estando ainda envolvida no processo de envelhecimento (SIES, 1991), além de doenças respiratórias como DPOC (RAMÍREZ-PRIETO et al., 2006), alergias respiratórias (BOWLER et al., 2002), síndrome da angustia respiratória aguda (LLOPART, 2012) e tuberculose (NICHOLSON et al., 1996). É importante lembrar ainda que as espécies reativas em geral podem ser ao mesmo tempo causa e consequência de patologias humanas associadas ao estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

Hoje em dia, as doenças inflamatórias vêm sendo relacionadas a um desbalanço no mecanismo de oxido redução ou redox e efeitos do excesso de espécies oxidantes nos organismos. Por isso, observa-se um enorme interesse no estudo de antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo (BARREIROS, 2006).

A inflamação mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) está envolvida na patogênese de doenças infecciosas, incluindo tuberculose e choque séptico (WELBOURN & YOUNG, 1992) e nas doenças imunes e auto-imunes, tais como artrite reumatoide e as doenças inflamatórias do intestino (PARKE et al., 1991).

O estresse oxidativo pode modular de formas variadas o sistema imune. A ingestão de micronutrientes é essencial para o funcionamento adequado deste sistema (DRAIN et al., 2007). Deste modo, a capacidade antioxidante é influenciada pela ingestão de certos micronutrientes, pois estes são necessários para a atividade de importantes enzimas antioxidantes (BOLIN, 2012).

Sabe-se que todos os organismos desenvolvem mecanismos de compensação. Desta forma, a produção contínua dos radicais livres durante os processos metabólicos fez com que o organismo desenvolvesse uma maneira de compensação, conhecida como defesas antioxidantes. Estas defesas limitam os níveis intracelulares das espécies reativas e controlam a ocorrência de possíveis danos através de reações detoxificadoras da EROs e ERNs (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

As defesas antioxidantes (FIGURA 11) são constituídas por um conjunto complexo de enzimas endógenas como GSH-redutases, GSH-tranferases, GSH-peroxidases, superóxido dismutases e catalase, além de inúmeros fatores antioxidantes endógenos como Glutathione e outros tiois, proteínas heme, coenzima-Q, bilirrubina e uratos (PARKE, 1999) juntamente com uma variedade de fatores nutricionais, principalmente as vitaminas antioxidantes como o ácido ascórbico (vitamina C), os tocoferóis (vitamina E) o β -caroteno e o retinol (vitamina A, o selênio e a metionina (CERQUEIRA et al., 2007) .

As enzimas antioxidantes endógenas operam grande número de sistemas de reparo, como por exemplo, a redução das quinonas e dissulfetos tóxicos, detoxificação das EROs e redução dos peróxidos solúveis ligados a membrana . Já as vitaminas C, E e os retinóis, fornecem um sistema antioxidante integrado com o GSH dos tecidos (LIU et al., 1993), detoxificando as espécies reativas de oxigênio e protegendo os tecidos dos danos oxidativos

induzidos pelos EROs, característicos das doenças inflamatórias agudas ou crônicas (LUNDBERG et al., 1992; PARKE, 1999).

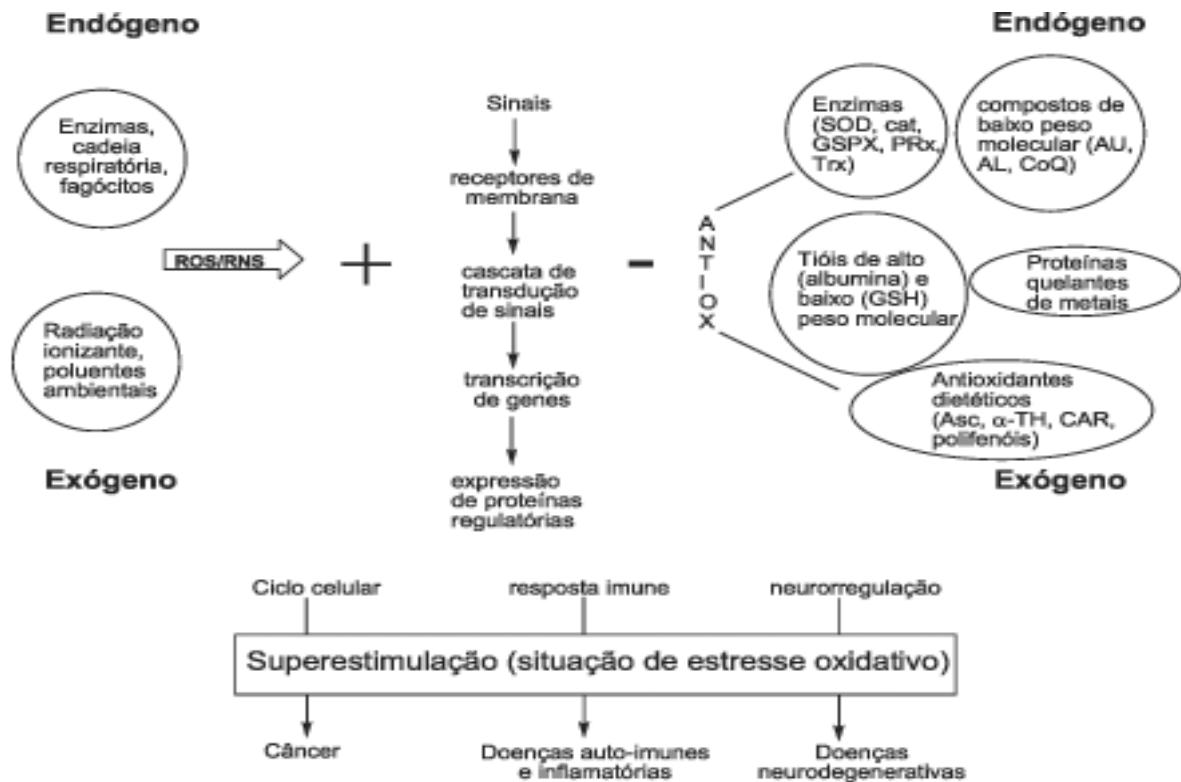


Figura 11: Atuação do sistema antioxidante e sua interação com o estado de estresse oxidativo;
Fonte: CERQUEIRA et al., 2007.

3.0. A EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA E A RELAÇÃO TB, eNOS E ECA

A epidemiologia genética é o estudo da etiologia, distribuição e controle de uma doença em grupos de familiares e dos determinantes genéticos de uma doença nas populações (KAPRIO et al., 2000).

As duas principais metas desta área científica são: a identificação de fatores genéticos de risco envolvidos na patologia em estudo e a quantificação do seu impacto na ocorrência da população em geral (CORREIA, 2008).

O primeiro objetivo das investigações de epidemiologia genética é determinar se uma doença tem uma componente genética e qual a sua importância em relação aos fatores ambientais, que vão desde o ambiente intrauterino até aos aspectos sociais (BURTON et al., 2005).

Atualmente, sabe-se que a epidemiologia genética sofreu uma progressão de sua abordagem inicial que considerava somente estudos sobre doenças mendelianas raras para análise de características complexas, ou seja, que são influenciadas por um grande número de fatores (FEITOSA & KRIEGER, 2002) (FIGURA 12).

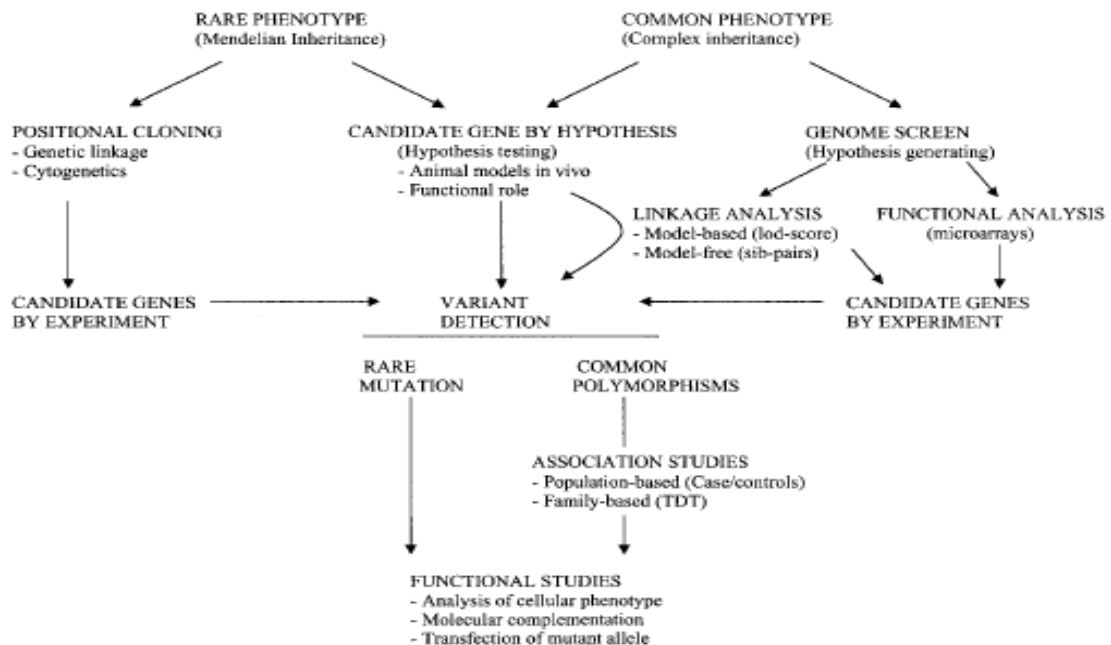


Figura 12: Métodos e estratégias para identificar a susceptibilidade genética humana;

Fonte: REMUS et al, 2003.

Há um princípio em patologia geral no qual três fatores deveriam sempre ser levados em conta em uma doença infecciosa:

- ✓ O agente patogênico;
- ✓ O grau de resistência do hospedeiro à infecção;
- ✓ As condições ambientais (FEITOSA et al, 1995);

Em se tratando da Tuberculose, é aceito que o grau de resistência das novas cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes aos medicamentos venha desempenhando um dos papéis mais importantes entre os fatores que interferem na manifestação da doença, assim como a pandemia do vírus da AIDS (CHACÓN et al., 2004).

Graças ao desenvolvimento da ciência, tal como o conhecimento do genoma da bactéria e o desenvolvimento da tecnologia genômica, foram introduzidos nas pesquisas instrumentos que permitiram o desenvolvimento de novas técnicas que possibilitam a

manipulação genética do bacilo a fim de descobrir quais os genes de susceptibilidade do parasita (JACOBS et al., 1987; COLE et al., 1998).

No trabalho de Chacón (2004) foram analisados vários experimentos de inativação gênica em *Micobactérias*, através das quais foram gerados mutantes de *M. tuberculosis*. Os genes inativados podiam estar relacionados com a biossíntese da parede celular, um componente estrutural que é quantitativa e qualitativamente importante para a fisiologia bacteriana e suas proteínas associadas, como também nos genes relacionados a biossíntese, ao metabolismo e transporte de metabólitos e nutrientes como aminoácidos, metais e ácidos graxos e, os genes envolvidos nos processos complexos que desempenham papéis importantes na adaptação micobacteriana a diferentes fatores ambientais, tais como a regulação da transdução de sinais, de transcrição e a resistência aos mecanismos bactericidas dos macrófagos (QUADRO 1). Para a inativação destes genes, foram usados métodos como: luz ultravioleta (KONICKOVA-RADOCHOVA et al., 1970), vetores adequados (plasmídios), fagos, fasmídeos e transposons que permitiram a inativação dos genes por recombinação homóloga e a geração de mutações ao acaso (BALASUBRAMANIAN et al., 1996; BELISLE et al., 1997; CAMACHO et al., 1999; COX et al., 1999; PIDDINGTON et al., 2001; SASSETTI et al., 2003;).

Função geral	Função específica	Genes inativados
Parede celular e proteínas associadas	Síntese e transporte de dimicocerosatos	ppsA-E, fadD28, drrC, mmpL7, fadD26, msl6 (pks 12), msl5 (pks8, pks17)
	Síntese e transferência de ácidos micólicos e trealoses	pca (umaA2), cmaA2, mmaA2, hma (cmaaA, mmaA), fbpA, fbpB, fbpC2, msl3 (pks2, pks4)
	Síntese de sulfolipídios	pks2 (msl2), mmpL8
	Proteínas associadas	erp (pirG)
Biossíntese, metabolismo e transporte de metabolitos e nutrientes	Biossíntese de aminoácidos	lysA, leuD, metB, proC, hisD, trpD, argF, glnA1
	Captação do ferro e regulação dependente de ferro	ideR, mbtB, mramp,
	Transporte de magnésio	mgtC
	Metabolismo de ácidos graxos	panC, panD, icl
Transdução de sinais e transcrição	Sistemas de dois componentes	mtrA, prrA, phoP
	Fatores sigma	sigF, whiB3, sigH, sigE
Resistencia a mecanismos bactericidas dos macrófagos	Enzimas detoxificadoras de reativos intermediários do oxigênio ou nitrogênio	katG, sodA, sodC, ahpC

Quadro 1: Inativação de genes do *Micobacterium tuberculosis* e sua relação com funções estruturais e metabólicas da bactéria;

Fonte: Adaptado de CHACÓN et al., 2004.

Não só o parasita tem sido testado à procura de genes de susceptibilidade ou resistência, o envolvimento de genes humanos na tuberculose tem sido sugerido por inúmeras observações epidemiológicas, é por isso, que tanto a infecção por *M. Tuberculosis* como os resultados da tuberculose clínica geram complexas interações entre o agente infeccioso, os fatores ambientais e o hospedeiro (ABEL & CASANOVA, 2000).

Acredita-se que o *M. tuberculosis* possa ter exercido alguma influência sobre a manutenção dos polimorfismos genéticos do genoma humano, devido ao fato de esta doença vir se apresentando e se mantendo em várias épocas diferentes desde os períodos mais remotos da humanidade até os dias de hoje (BELLAMY, 1998).

Estima-se que apenas 10% das pessoas infectadas com *M. tuberculosis* desenvolverá a doença clínica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; COELHO, 2012), e que somente em alguns casos, há a ocorrência da identificação de um fator de risco óbvio como idade avançada, diabetes, abuso de álcool, infecção pelo HIV, ou a utilização de corticosteróide (BELLAMY et al, 2000).

Os estudos sugerem que a TB humana é causada pela susceptibilidade genética do hospedeiro, e teve estudos embasados primeiramente através da análise de gêmeos (KALLMANN & REISNER, 1943; COMSTOCK, 1978), modelos animais (BLACKWELL et al., 2004) como também, posteriormente, análises de segregação (SHAW et al., 1997; STEIN et al., 2005).

Novas tecnologias estão acelerando nosso entendimento dos genes do hospedeiro envolvidos na susceptibilidade e resposta a infecção. A arquitetura genética da resposta do hospedeiro pode ser surpreendentemente complexa. Como exemplo pode-se citar a resposta as infecções micobacterianas que parecem estar sob o controle de um *continuum* genético que varia de fatores mendelianos a influências multigênicas complexas, cujo equilíbrio do qual essa variação é dependente está relacionado a idade do hospedeiro (FALKOW, 2004; CHAKRAVARTI et al., 2009).

Variados estudos vem mostrando que o nível de resistência de uma pessoa a infecção por *M. Tuberculosis* está correlacionada com a região de sua descendência, e que os antepassados de pessoas mais sensíveis, tendem a vir de áreas já livres da doença (STEAD, 1992). Stead (1997) comenta que a incidência da tuberculose clínica tem sido encontrada por ser particularmente elevada durante surtos em populações, como a de nativos americanos, sem experiência ancestral da infecção. Alguns estudos com gêmeos também demonstraram a

importância dos genes do hospedeiro, uma vez que às taxas de concordância para a tuberculose clínica entre os gêmeos monozigóticos se apresentaram mais elevadas do que entre os pares dizigóticos (KALLMANN, 1943; COMSTOCK, 1978).

Especula-se que as populações negras tenham maior suscetibilidade à tuberculose do que as populações brancas, talvez porque a tuberculose tenha sido endêmica na Europa por um período muito mais longo e tenha tido, portanto, uma força evolutiva maior e mais significativa (DUBOS & DUBOS, 1952). As maiores taxas de tuberculose apresentam-se entre pessoas que sejam descendentes ou de populações negras, estas pessoas também são mais propensas a desenvolver as formas mais fulminantes da doença (WAKSMAN, 1964).

Estudos de base populacional vêm relatando associações entre genes candidatos e casos clínicos de tuberculose. Estes genes foram selecionados com base no seu papel conhecido ou suspeito de uma possível relação com a imunidade adaptativa ou inata através de sua propriedade antimicobacteriana (HILL, 2006). Dentre os diversos estudos de genes candidatos que têm sido conduzidos, observa-se o destaque nos estudos genômicos de ligação com populações Afro-americanas, onde foram identificadas sete regiões cromossômicas que mostraram evidências provisórias de co-hereditariedade com a tuberculose clínica (BELLAMY et al., 2000), estas sete regiões foram examinados em um conjunto de 81 pares de irmãos, com marcadores nos cromossomos 15q e Xq os quais mostraram evidências de ligação à tuberculose. No referido estudo também foi encontrado um gene de susceptibilidade no cromossomo X o qual foi sugerido por estar associado ao fato de que a tuberculose se apresenta mais no sexo masculino do que no feminino como pode ser observado em diversas populações. Outros estudos em populações asiáticas onde se verificou, através da genotipagem, uma região no cromossomo 5q que pode estar ligada a tuberculose e duas regiões candidatas nos cromossomos 17p e 20p. Estas descobertas sugerem que o conceito clínico-patológico de comprometimento do sistema imunológico é diferente entre pacientes com tuberculose jovens e velhos na população asiática (MAHASIRIMONGKOL et al., 2009; STEIN, 2011).

Pesquisas versando sobre epidemiologia genética vêm sendo feitas em populações variadas na busca dos polimorfismos genéticos associados à tuberculose, a maioria deles está relacionada a susceptibilidade do hospedeiro. Os genes que são mais estudados fazem parte do sistema imunológico e a maioria se refere a genes candidatos específicos como HLA-DR, IFN- γ , MAL/TIRAP, CCL2, NRAMP1/SLC11A1, receptores de macrófagos tais como

receptor de manose (MR, CD206), receptores específicos de células dendríticas ICAM-3, receptores TLRs, citocinas fagocíticas como os fatores de necrose tumorais (TNF), e as interleucinas 1 β - (IL-1 β), IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, como também as quimiocinas IL-8, as proteínas quimio-atrativas de monócitos 1 (MCP-1), RANTES e CXCL10 e também algumas importantes moléculas da imunidade inata como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (HILL, 2006; AZAD et al., 2012).

O complexo genético MHC (*Major Histocompatibility Complex*) designado no homem como HLA (*Human Leukocyte Antigens*) é caracterizado por apresentarem vasta gama de polimorfismos. Este complexo codifica uma molécula apresentadora de antígeno que está envolvida no reconhecimento e cooperação das funções celulares (MAGALHÃES et al., 2004). No MHC existem atualmente mais 6.810 alelos HLA descritos, o que faz com que este complexo genético cause um forte impacto em termos de eficiência na resposta imune. Dentre todas as variações conhecidas, algumas causam proteção contra TB e outras mostraram forte indicação de susceptibilidade (SADKI et al., 2012). Os genes deste complexo são divididos em duas classes (classe I e classe II), segundo a especificidade do antígeno apresentado (CHANG et al., 2008).

Nos casos de tuberculose pulmonar, estudos de associação caso-controle têm encontrado significantes associações entre os polimorfismos do HLA e a patologia (YIM & SELVARAJ et al., 2010). Estudos analisados indicam que os maiores *loci* de susceptibilidade estão dentro da região do HLA de classe II em comparação com os localizados na região do de classe I (KETTANEH et al., 2006).

As populações indianas apresentaram associação positiva da tuberculose com o HLA de classe I para os alelos B51(VIJAYA et al., 2006) e Cw7 (BALAMURUGAN et al., 2004). Com relação a classe II os alelos associados foram DR2 (BRAHMAJOTHI et al., 1991), DRB1*1501 e DQB1*0601 (RAVI KUMAR et al., 1999). Os alelos DRB1*15 (SHI et al., 2011) e DRB1*16 (DUBANIEWICZ et al., 2000) de classe II tiveram associação positiva nas populações chinesa e polonesa respectivamente. Em populações Sul-africana e Síria os alelos de susceptibilidade foram DQB1*0301 - *0304, DRB1*1302 (LOMBARD et al., 2006) e DRB1*04 (HARFOUCH-HAMMOUD & DAHER, 2008). Em população do Irã, Amirzargar et al. (2004), encontraram susceptibilidade para o alelo DRB1*07 e, nas populações Tailandesas, a associação apresentada ocorreu com o alelo DQB1*0601 (RAVI KUMAR et

al., 1999). Duarte et al., (2011), estudaram HLA em uma população portuguesa, não sendo encontrada nenhuma associação significativa no referido trabalho.

Na ultima década, a produção do interferon gama (IFN- γ) em resposta a antígenos micobacterianos específicos tem recebido muita atenção, passando a ser conhecido como o biomarcador mais confiável e específico da infecção por *M. tuberculosis* (MENZIES et al., 2007; PAI et al., 2007). O IFN- γ é um agente anti-viral e anti-parasitário produzido pelos linfócitos T CD4+/CD8+ e pelas células *natural killer*, que são submetidos a ativação por antígenos, mitógenos e alo-antígenos (GALVÃO et al., 2012).

Ting et al., (1999) observaram que o IFN- γ ativa os macrófagos para matar diversos patógenos intracelulares, mas não o ativa para matar o *M. tuberculosis* virulento. Eles descobriram que o mecanismo utilizado pelo bacilo para invadir a resposta imune humana é inibindo as vias de sinalização do IFN- γ e que este mecanismo de inibição é diferente do usado por *Leishmania donovani*, o qual atinge a interação do START1 com o aparelho basal de transcrição.

Connell et al., (2010) obtiveram resultados positivos ao utilizar o IFN- γ para tratamento de crianças tuberculosas infectadas com HIV. Green et al., (2013) descobriram que o IFN- γ participa do controle da tuberculose não só em humanos como em ratos. Seus estudos identificaram que o IFN- γ produzido pelas células T CD4+ inibem a replicação intracelular do *M. tuberculosis* nos macrófagos conferindo resistência do hospedeiro ao desenvolvimento da doença. Corral et al., (2009) demonstraram que polimorfismos neste marcador representa um alto risco de desenvolvimento de tuberculose em contatos domiciliares com pessoas doentes em populações colombianas.

Outro gene muito citado em estudos caso-controle é o NRAMP/SLC11A1, um membro da família dos transportadores de soluto 11, prótons divalentes acoplados aos metais no transporte de íons (GRUENHEID & GROS, 2000). Sua atuação está envolvida no metabolismo do ferro e na resistência a certos agentes patogênicos. Dependendo do pH as mutações neste gene são associadas com susceptibilidade a doenças infecciosas tais como tuberculose e lepra e a doenças inflamatórias como artrite reumatoide e doença de Crohn (HANTA et al., 2012). Muitos estudos associaram o NRAMP a tuberculose, especialmente em populações asiáticas (MEILANG et al., 2012).

Bellamy (2000) utilizou duas abordagens para investigar o papel de genes do hospedeiro na susceptibilidade à tuberculose em africanos. Uma foi o estudo de ligação,

objetivando rastrear, no genoma humano inteiro, as regiões que contêm um grande potencial de *loci* para susceptibilidade a tuberculose. Neste trabalho, foram tipados 92 pares de irmãos para 299 marcadores microssatélites abrangendo os 23 cromossomos. Sete regiões mostraram alguma evidência de co-segregação com a doença. Tais regiões foram examinadas em um segundo conjunto de 81 pares de irmãos, sendo que os marcadores para as regiões 15q e Xq mostraram evidências de ligação à tuberculose. O gene de susceptibilidade no cromossomo X pode contribuir para o excesso de tuberculose observada em homens de diversas populações.

Já a abordagem de gene candidato comparou a frequência de polimorfismos em vários genes (VDR, NRAMP1 e TNF- α) em mais de 400 pacientes com diagnóstico positivo para tuberculose pulmonar e 400 combinados étnicos de controles saudáveis. Este estudo teve como resultado a associação dos polimorfismos em genes que codificam para a proteína de resistência natural associada a macrófagos – NRAMP1, o receptor da vitamina D - VDR e a lectina de ligação a manose - MBL com a tuberculose. A associação positiva da TB com estes genes foi encontrada nas populações chinesa (LIU et al., 2004), muçulmana (SHARMA et al., 2011), Iraniana (MERZA et al., 2009), dentre outras.

O complexo *M. tuberculosis* é o agente etiológico que está presente em todos os tipos de TB (STERLING et al., 2001; SHARMA et al., 2004). Existe uma lacuna na tentativa de correlacionar dados de genótipos de *M. tuberculosis* e o rastreamento das ligações de transmissão entre humanos. Há relatos de casos em que pessoas infectadas ligadas epidemiologicamente estejam infectadas com cepas não relacionadas (BARNES & CAVE, 2003; COLE et al., 1998). Outra vantagem da genotipagem, é que ela pode diferenciar a recorrência e a re-infecção da infecção (SANKAR et al., 2012).

Faz-se urgente o encontro de novas formas de combater a tuberculose, uma das doenças mais infecciosas e fatais em todo o mundo (MURRAY & SALOMON, 1998; DYE et al. 1999). Um dos pontos fundamentais para este combate é a identificação dos genes do hospedeiro com seus alelos funcionais que controlam a resposta a infecção micobacteriana (KAUFMANN et al., 2006). Tal definição propiciará o desenvolvimento de novos métodos preventivos como a detecção precoce, bem como ao acompanhamento prolongado de indivíduos de alto risco e/ou o tratamento a pacientes cujas respostas imunitárias para a TB são deficientes.

4.0 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA – SRAA

O SRAA (FIGURA 13) é um complexo sistema neuroendócrino (GIESTAS et al., 2010), em que cada componente da cascata que o compõe é produzido em diferentes órgãos, determinando um arranjo que funciona como exemplo da interação de vários sistemas orgânicos, todos engajados na luta para manter a estabilidade hemodinâmica, que tem como atributos principais a modulação do equilíbrio hidroeletrólítico, a regulação da pressão arterial (ZHUO & LI, 2011), o metabolismo do sódio e a hemodinâmica dos rins (WANG et al, 2011).

Este sistema tem como função responder a uma instabilidade hemodinâmica e evitar a redução da perfusão tecidual sistêmica (RIBEIRO e FLORENCIO, 2000). Sua atuação se dá contrariando a tendência de hipotensão arterial, pela indução da vasoconstrição arterial periférica e pelo aumento do volume plasmático por meio de retenção renal de sódio (ação da aldosterona) e água (pela liberação de ADH-vasopressina) (CAMPBELL et al, 1987).

Os pontos limitantes do sistema renina angiotensina aldosterona são o substrato primário (angiotensinogênio) e duas enzimas, Renina e Enzima conversora de angiotensina I (ECA) que, em última análise, representam a principal via de produção de angiotensina II (principal efector do sistema) (GOMES, 2007).

No organismo humano pode-se encontrar dois tipos de sistemas renina angiotensina aldosterona, o circulante e o local (REGO, 2009). Como componentes do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona circulante temos o angiotensinogênio, que é produzido no fígado, mas requer glicocorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas (OLIVEIRA, 2010). A renina sendo liberada pelos rins, enquanto que a ECA é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos (SANJULIANI et al., 2011).

O SRAA contribui para proteção dos tecidos endotelial, cardíaco, cerebral, renal e, regula ainda a resposta do endotélio à inflamação e lesão (WHALEY-CONNELL et al., 2007). Se for ativado cronicamente, induzirá a hipertensão e a perpetuação de uma cascata pró-inflamatória, pró-trombótica e aterogênica, que está na base da lesão de vários órgãos-alvo (coração, cérebro, rim e endotélio) (GIESTAS et al., 2010).

Várias consequências hemodinâmicas e humorais têm sido relacionadas à ativação do SRAA, como isquemia miocárdica, hipertrofia ventricular esquerda, arritmias, alterações no equilíbrio coagulação-fibrinólise e aumento do estresse oxidativo (GRAVAS & GRAVAS,

1998). O angiotensinogênio é uma α -2 globulina composta por 411 aminoácidos, sendo que o fígado é o órgão mais importante da expressão de seu gene, porém, o mRNA é expresso em vários lugares extra-hepáticos, incluindo o cérebro, grandes artérias, rim, tecido adiposo e coração (CONTRA et al., 2008).

Estimou-se que mais de 85% da angiotensina I é formada dentro do tecido, em vez do plasma. Sua produção é estimulada em resposta aos glicocorticoides, estrogênios e citocinas inflamatórias (interleucina-1 e fator de necrose tumoral) (WANG et al., 2011), estando circulante no plasma como um peptídeo biologicamente inativo, sobre o qual irá atuar a renina, gerando uma sequência de substâncias ativas (KUCHAREWICZ et al., 2002).

A renina é uma enzima proteolítica que atua regulando uma etapa limitante do SRAA convertendo o angiotensinogênio (411 aminoácidos) ao clivar sua porção N-terminal a fim de formar o decapeptídeo Ang. I (FYHRQUIST & SAIJONMAA, 2008). É sintetizada por células justaglomerulares e sua forma ativa é produzida a partir da remoção proteolítica de um segmento peptídico na região N-terminal da pró-renina, o precursor da renina (IRIGOYEN et al., 2001).

A renina atua sobre o angiotensinogênio, transformando-o em Angiotensina I. Esta, por sua vez, é convertida proteoliticamente em Angiotensina II pela ECA, principalmente a nível pulmonar, mais precisamente nos capilares pulmonares (BARRIOS et al., 2002). A angiotensina II é levada pela corrente sanguínea aos diversos órgãos – alvo, onde produz a devida resposta fisiológica (WEBB et al, 1985).

A secreção da renina é estimulada por reduções da pressão de perfusão ou do conteúdo de cloreto de sódio (NaCl) e por aumento da atividade simpática, e sua secreção ativada é regulada pelos fatores abaixo relacionados (JALIL e OCARANZA, 2002):

- Alterações na concentração de NaCl.
- Mecanismo barorreceptor renal na arteríola aferente sensível a alterações da pressão de perfusão renal.
- Estimulação nervosa simpática pelos receptores adrenérgicos β -1.
- *Feedback* negativo por ação direta da Ang. I nas células justaglomerulares.

Polimorfismos nas principais enzimas do SRAA podem provocar alterações em seu funcionamento e causar danos a homeostase do organismo. Um dos focos do presente trabalho é o polimorfismo de "inserção" (I) e "deleção" (D) encontrado no gene da ECA. A literatura demonstra que os alelos polimórficos I e D influenciam o nível da ECA circulante.

Baixos níveis plasmáticos de ECA e de angiotensina II estão relacionados com genótipo homozigoto para “inserção”, enquanto os altos níveis da enzima relaciona-se com a presença do genótipo DD (FRANKEN et al., 2004; MUNHOZ et al., 2005; COELHO et al., 2006; DIKMEN et al., 2006; FRANCO et al., 2007; PAN et al., 2007; ROLA, 2008).

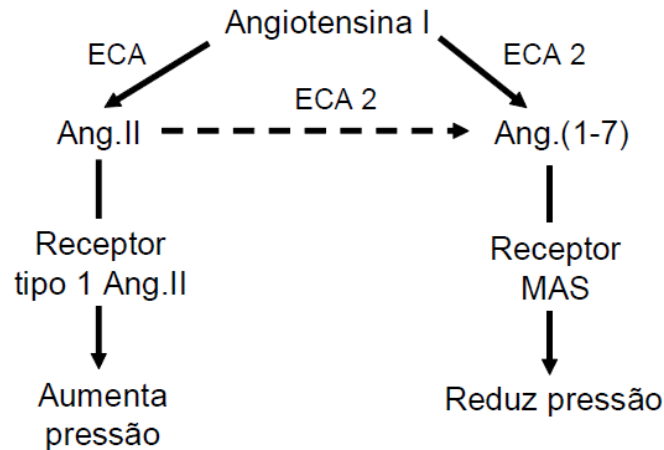


FIGURA 13: Esquema fisiológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona.
FONTE: GIESTAS et al., 2010.

4.1 O GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA – ECA

O gene DCP1, codificador da ECA humana localiza-se no cromossomo 17q23 (Mattei, 1989 appud OMIM, 2012), é composto por 26 exons interrompidos por 25 introns (PULLA REDDY et al., 2010), que se estendem por cerca de 25 kb do DNA, pesando 21 KDa (MOHAMMADI et al., 2008). A pré-proteína sintetizada por este gene tem 732 resíduos, cujo peptídeo sinal é formado por 31 aminoácidos, dando origem a uma proteína madura com 80.073 KDa (EC 3.4.15.1) e contém algumas regiões polimórficas (HASHIMOTO et al., 2012).

Somente neste gene, considerado altamente polimórfico, são conhecidos aproximadamente 160 polimorfismos, sendo a maioria do tipo *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), que se localizam em zonas não-codificantes (somente 34 se encontram em zonas codificantes). Também podem ser encontradas no gene DCP1 18 mutações *missense* (SAYED-TABATABAEI et al., 2006).

Dos polimorfismos encontrados no gene da ECA, o mais estudado é caracterizado pela presença/ inserção (I), ou ausência/deleção (D) de uma sequência *Alu* com 287 pares de bases

no íntron 16 (EL-SHAFFI et al., 2011). Uma vez que esta sequência é muito semelhante a outros elementos *Alu* específicos do homem, levantou-se uma hipótese que foi corroborada pela genotipagem realizada em chimpanzés ter revelado a ausência desta sequência, o que indica que esta mutação possa ter ocorrido após a separação evolutiva entre o chimpanzé e o homem (RIEDER et al., 1999). A partir da presença deste elemento pode-se observar a ocorrência de três genótipos: os homozigotos DD e II, e o heterozigoto DI.

Além do polimorfismo de inserção/deleção do íntron 16, outros dois polimorfismos, ECA4 (A-240T) e ECA8 (A2350G), do gene da ECA também são considerados importantes com relação à variação dos níveis da enzima circulante (ZHU et al., 2001).

As frequências alélicas para os alelos ECA*D e ECA*I variam entre as populações. Em populações europeias ECA*D foi observado com frequência máxima entre espanhóis (0,63) e mínima entre poloneses (0,43) (VAN DER KNAAP, et al., 2008; VILLAR et al., 2008). Em asiáticos, o referido alelo variou de 0,24 em Taiwan (LUE et al., 2006) a 0,44 no sul da Índia (RAMU et al., 2011). No continente africano, um estudo realizado no Egito evidenciou o referido alelo com frequência de aproximadamente 0,31 (ELSHAMAA et al., 2011).

Os níveis de ECA são variáveis com a idade (RIGAT et al., 1990; CAMBIEN et al., 1988), sendo sua atividade bastante elevada na infância (LANDAZURI et al., 2008), e vai diminuindo até atingir os níveis adultos. Os níveis plasmáticos da ECA são estáveis em cada indivíduo, mas diferem grandemente entre indivíduos diferentes. Esta variação é fortemente influenciada pelo polimorfismo I/D (RIGAT et al., 1990; MENDONÇA et al., 2004).

A presença do alelo D está associada aos maiores níveis de transcrição do RNA mensageiro do gene da ECA (ANDRADE, 2009). Segundo Panagiotopoulos et al (1995), concentrações plasmáticas da ECA são significativamente maiores em indivíduos homozigotos para o alelo ECA deleção (DD) e menores nos homozigotos para o alelo ECA inserção (II). Este polimorfismo está fortemente associado aos níveis da enzima circulante, com média de atividade no plasma dos portadores do genótipo DD sendo cerca de duas vezes mais que a dos portadores do genótipo II e, tendo os heterozigotos níveis intermediários. Desta forma, os homozigotos DD são expostos a níveis mais elevados de Angiotensina II (JEUNEMAITRE et al., 1992; HAHNTOW et al., 2010).

Esta afirmação pode ser verificada no estudo de RIGAT et al., (1990), no qual o polimorfismo representou 47% da variabilidade dos níveis desta enzima no soro humano, foi

encontrado que indivíduos com genótipo DD apresentaram 494,1 µg/l de ECA no plasma; os DI, 392,6 µg/l e os II, 299,3 µg/l. Nos resultados deste estudo não foram encontradas diferenças nos níveis séricos entre os sexos. Entretanto, existem estudos indicando que o estrogênio e a testosterona podem modular a atividade da ECA (FRESHOUR et al., 2002; GALLAGHER et al., 1999). Os polimorfismos no gene da ECA são utilizados como marcadores biológicos de várias doenças, principalmente cardiovasculares (ALMADA et al., 2010; BECARI et al., 2011), e tem sido amplamente utilizado em estudos de ancestralidade humana (PARDONO et al., 2012; PEREIRA, 2010).

A ocorrência de uma inserção *Alu* no gene da ECA em uma região intrônica, leva a possibilidade de que algumas hipóteses possam ser sugeridas para explicação da diferença entre os níveis séricos da enzima entre os portadores dos alelos D e I (PEDROSO, 2006). A primeira hipótese afirmaria que o alelo I não comprometeria, por si só a produção enzimática, pelo fato deste alelo estar ligado a outra mutação que poderia afetar a expressão gênica. A observação da frequência relativamente alta deste alelo na maioria das populações é compatível com a possibilidade de sobrevivência de um indivíduo portador e que, desta forma, existiria um desequilíbrio de ligação do fragmento de inserção com essa outra mutação. A segunda hipótese seria de que o fragmento *Alu* poderia alterar o *splicing* do gene da ECA, afetando o processo de transcrição, ou ainda, em uma terceira hipótese, a participação do elemento *Alu* na regulação da expressão do gene ECA por algum mecanismo de controle pós-transcricional envolvendo um microRNA (MARTINS, 2011).

Os níveis séricos da ECA são elevados em uma variedade de doenças granulomatosas incluindo sarcoidose, silicose e tuberculose miliar. O mecanismo sugerido do aumentado nível de ECA no soro é que sua secreção na circulação ocorre por células do sistema macrófago-fagocítico (células epitelióides) nos granulomas (KWON et al., 2007).

4.2 A ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA - ECA

A ECA, também referida na literatura como Cininase II, antígeno CD143 ou Quinina II, é assim chamada devido a sua capacidade de degradar a bradicinina (LEE et al., 2005), constitui uma proteína com função enzimática responsável pela remoção de dois aminoácidos da angiotensina I para obter Angiotensina II, um hormônio octapeptídico ativo,

potente vasoconstritor que atua através do receptor de AT1, estimulando a proliferação de células da musculatura lisa e a hipertrofia cardíaca (LEE et al., 2000; CAREY et al., 2003; SCHMAIER, 2003).

Glicoproteína pertencente à classe das metaloproteases de zinco, dependente de Cl(-), é produzida por várias células do corpo, dentre elas, as células do endotélio capilar e monócitos, que são convertidos em células secretoras (DIMANTAS et al., 2003). Ocorre geralmente ligada à membrana das células endoteliais (HUBERT et al., 1991), como também em diferentes tipos de células epiteliais e neuroepiteliais, podendo ser encontrada na forma circulante dos fluidos biológicos, tais como plasma, líquido amniótico e fluidos seminais (RIGAT et al., 1990). Sua ativação se dá em pH neutro de 7 a 8, e pode ter atividade endopeptidásica sobre alguns substratos, esta mesma atividade cai rapidamente de acordo com a diminuição do pH (CONTRA et al., 2008).

A ampla distribuição de ECA em vários tecidos do corpo sugere que, para além do seu importante papel no metabolismo de péptidos vasoativos, a ECA é provavelmente envolvida no metabolismo de outros péptidos, como os neurotransmissores (ERDOS e SKIDGEL, 1987).

Esta enzima pode ser encontrada em três isoformas e em locais diferentes. A transcrição da proteína se dá por *splicing* alternativo e pode originar duas isoformas da ECA, a testicular e a somática (SILVA, 2011).

A **ECA somática (ECAs)** (FIGURA 14a) é transcrita por um promotor localizado na extremidade 5' do primeiro éxon do gene da ECA (Spro), que transcreve todos os éxons, menos o 13 (SAYED-TABATABAEI et al., 2006). Sua tradução dá origem a uma glicoproteína com 1306 aminoácidos de 170 KDa e com dois domínios catalíticos (próximos dos terminais N e C). A ECAs é expressa em tecidos somáticos como os vasos sanguíneos, rins, coração, intestinos, pulmões, bem como em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais e principalmente no cérebro (KLEIN, 2001). Consiste em uma ectoenzima unida à membrana celular que tem uma região extracelular hemodimérica (OPARIL et al., 2004). Esta região tem dois domínios homólogos com um sítio catalítico ativo (sítio ativo N-terminal e sítio ativo C-terminal). O domínio N-terminal é uma ancora transmembranar com uma pequena cauda intracelular carboxi (PERICH et al, 1992). O Sítio C-terminal além de ser responsável por 75% da atividade da enzima, também faz a conversão da Angiotensina I em Angiotensina II (WEI et al., 1991).

A **ECA germinativa ou testicular (ECA_t)** (FIGURA 14b) é também um glicoproteína de 90 KDa, de menor tamanho quando comparada a ECAs (NIU et al., 2002). Apresenta 732 aminoácidos e ainda não teve sua função fisiológica esclarecida (BAUDIN, 2000). É encontrada exclusivamente nas células germinativas dos testículos sendo por isso chamada de ECA germinativa (ECA_g) e se diferencia da ECA somática, pois esta possui apenas uma região amino terminal extracelular, sendo assim, apresenta somente um sítio catalítico ativo (KUMAR et al., 1989). A ECA_t é transcrita por um promotor interno específico localizado no intron 12 (Gpro), que transcreve os éxons de 13 a 26. Esta isoforma contém um único domínio catalítico encontrado junto ao domínio terminal C (KLEIN, 2001; SAYED-TABATABAEI et al., 2006; SILVA, 2011).

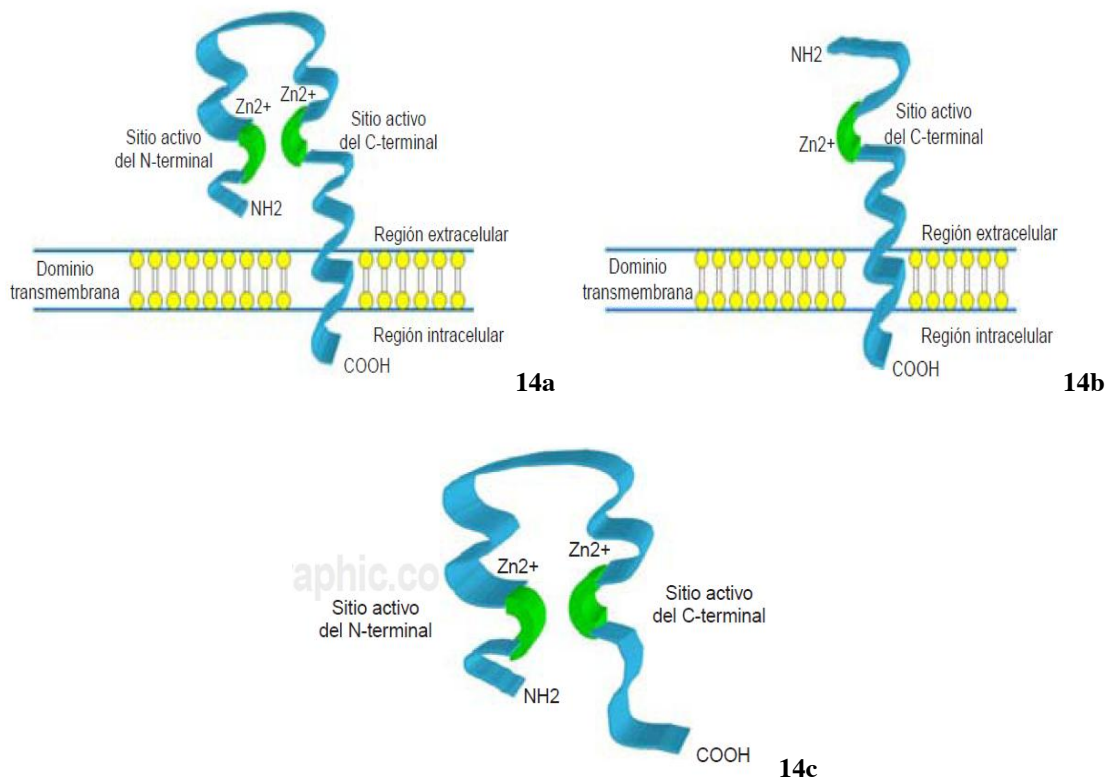


Figura 14a: Esquema da molécula de ECA somática e seu posicionamento na membrana; **14b:** ECA testicular; **14c:** ECA solúvel (ou plasmática);
Fonte: CONTRA et al, 2008.

Com relação à **ECA plasmática ou solúvel** (FIGURA 14c) é originada pela clivagem da ligação peptídica Arg1203-Ser1204 perto do terminal C. Esta forma tem uma estrutura semelhante à forma tecidual, não se encontrando ancorada à membrana plasmática, podendo ser detectada em vários fluídos corporais, como por exemplo: sangue, urina, líquido

cefalorraquidiano, etc. (NIU et al., 2002; KLEIN, 2001). Os níveis de ECA plasmática mantêm valores individuais constantes, havendo uma grande variabilidade interindividual, sem qualquer relação com fatores hormonais ou ambientais (BAUDIN, 2000; SILVA, 2011). Sendo assim, a ECA solúvel corresponde à porção extracelular da ECA somática possuindo dois sítios ativos (BELDENT et al., 1993).

A ECAs e a ECA_t compartilham 665 aminoácidos próximos ao terminal C. No terminal N estas isoformas possuem, respectivamente, 664 e 72 resíduos únicos (NIU et al., 2002).

A enzima ECA I, abordada mais enfaticamente neste trabalho, apresenta uma enzima homóloga, denominada ECA II, que tem seu gene localizado no cromossomo Xp22.2, e manifesta seus efeitos diretos relacionados a função cardíaca (BOEHM & NABEL, 2002). A ECA II se apresenta sendo expressa predominantemente nas células endoteliais vasculares do coração e do rim (CRACKOWER et al., 2002). Esta atua na conversão da angiotensina I em angiotensina 1-9, contendo 9 aminoácidos. Fazendo-se uma comparação entre a ECA I e a ECA II pesquisadores descobriram que a ECA I, converte angiotensina I em angiotensina II, com 8 aminoácidos, está relacionada a vasoconstrição, a ECA II faz a conversão de angiotensina I em angiotensina 1-9 que não tem nenhum efeito sobre os vasos sanguíneos, mas pode ser convertida pela ECA I em um peptídeo mais curto, a angiotensina 1-7 que funciona como um vasodilatador sanguíneo e tem efeito contrário ao da ECA I (TIPNIS et al., 2000).

A ECA é o principal componente do sistema renina-angiotensina tendo expressão nos rins, cardiomiócitos e pulmões (FIGURA 15), onde os níveis são elevados e pode exibir um efeito anti-inflamatório. Ela possui dois domínios catalíticos, cada um deles, com um zinco funcional dependente do sítio ativo (PULLA REDDY et al., 2010).

Esta enzima desempenha uma função fundamental na homeostase da pressão arterial, pela conversão da angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor, bem como por sua atuação no catabolismo das bradicininas (CAMBIEN et al., 1992) transformando-as em produtos inativos (MURPHEY et al., 2000). As bradicininas são potentes vasodilatadores que induzem a constrição da musculatura lisa das vias aéreas, no edema bronquial, na supersecreção de muco e na inflamação neurogênica (EL SHAFEI et al., 2011), tendo também importante atuação na vasoconstrição das artérias periféricas (SCHMAIER, 2003). É através da bradicinina que a ECA se relaciona com o sistema L-arginina - óxido nítrico. A bradicinina

é uma das substâncias que estimula a ação da sintetase do óxido nítrico na transformação da L-arginina em L-citrulina formando óxido nítrico (MATOS, 2006). Por outro lado, utilizando a conversão da angiotensina I no vasoativo angiotensina II ocorre a proliferação e contratilidade dos músculos lisos das vias respiratórias, o que pode causar uma obstrução excessiva dessas vias (SILVA & CERCHIARO, 2011).

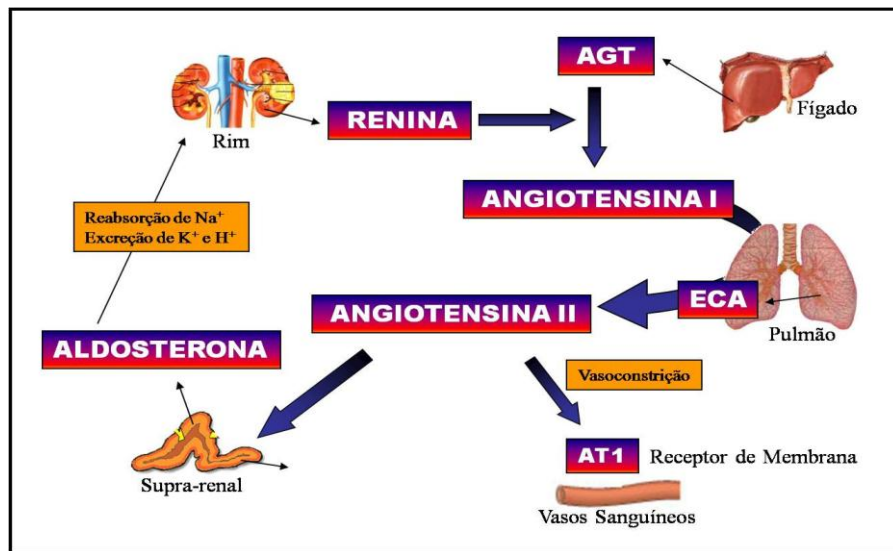


Figura 15: Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona ativo, enfatizando a produção de Angiotensinogênio pelo fígado, e a conversão a angiotensina II pela ECA nos pulmões.

Fonte: BONFIM-SILVA e RIOS, 2012.

Outras funções da angiotensina II são promover a ativação dos macrófagos, bem como adesão a parede vascular, levando ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas em pacientes com risco de infarto agudo do miocárdio (PULLA REDDY et al., 2010).

Hayashi & Camargo (2005) encontraram no veneno de uma cobra brasileira, da espécie *Bothrops jararaca*, o Piroglutamil, um oligopeptídeo rico em prolina, classicamente referido como peptídeo potencializador da bradicinina (BPPs). No mesmo estudo, os autores descobriram que estes peptídeos são inibidores naturais da ECA, sendo suas propriedades químicas e farmacológicas essenciais para o desenvolvimento do captopril, primeiro inibidor de sítio ativo dirigido para ECA, muito utilizado atualmente no tratamento de hipertensão.

Os valores normais da enzima dependem da técnica utilizada e os níveis séricos da ECA estão elevados na maioria dos casos de sarcoidose sistêmica ativa e outras situações que incluem hanseníase, tuberculose, histoplasmose, carcinomatose, linfomatose, granulomatose e sarcoma imunoblástico (BAARSMA et al., 1987). A ECA tem sido associada a várias

doenças pulmonares como síndrome do estress respiratório agudo (MARSHALL et al., 2002), asma (BENESSIANO et al., 1997), beriliose (MAIER et al., 1999), fibrose pulmonar (MORRISON et al., 2001) e sarcoidose (MALIARIK et al., 1998).

5.0 ÓXIDO NÍTRICO – NO

O Óxido nítrico (NO) foi descoberto na década de 80 quando vários pesquisadores se dedicaram a investigar evidências dos óxidos de nitrogênio no metabolismo (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; IGNARRO, 1987; MONCADA et al., 1988; RAPOPORT e MURAD, 1983).

Os experimentos foram iniciados com a demonstração da produção de nitratos em camundongos assépticos. Em seguida notou-se que nitritos e nitratos eram produzidos por macrófagos ativados pelos lipopossacárides bacterianos (FLORA-FILHO et al., 1998). Também se percebeu que a L-arginina atuava como substrato e produzia como co-produto a L-citrulina. Através dos trabalhos de Marletta (1988), o óxido nítrico foi reconhecido nos experimentos de oxirredução da L-arginina. Muito se especulava sobre qual era o fator responsável pela vasodilatação associada ao endotélio - ERDF, mas foi Furchgott (1984), que descobriu ser o óxido nítrico o responsável por essa atividade biológica.

5.1 CARACTERÍSTICAS, SÍNTESE E METABOLISMO.

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. É um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado (DUSSE et al., 2003). Este detalhe faz dele uma molécula altamente reativa (OLIVEIRA, 2011).

É formado a partir da reação de um aminoácido semi-essencial, a L-arginina ou a D-arginina, com o oxigênio molecular (SIASOS et al., 2007), em uma reação GT6 catalisada por uma das três isoformas (TABELA 1) produzidas pelo gene Óxido Nítrico Sintase (NOS): a induzível (iNOS), a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), localizadas em diferentes cromossomos e expressas em diferentes linhagens celulares (WOLFF et al., 2005). Suas denominações ocorreram de acordo com os tecidos onde foram clonadas e caracterizadas pela primeira vez (VIARO et al., 2000), sendo a produção do óxido nítrico pela eNOS sintetizada

em resposta a estímulos como hipóxia, estresse oxidativo e fluxo pulsátil (MONCADA e HIGGS, 1993).

Tabela 1: Informações genéticas das isoformas NOS humana. Adaptado de Alderton et al., 2001.

Isoformas da NOS Humana	Estrutura e dimensão do Gene	Localização cromossômica	Número de Amino ácidos (AA) nas formas predominantes e tamanho da proteína	Número de acesso do Genbank	Células que expressam NOS
nNOS (NOS-1)	29 éxons, 28 íntrons, organização do complexo estrutural	12q24.2-12q24.3 do cromossomo 12	1434 aa, 161 kDa	L02881, U11422	Neurônios;
iNOS (NOS-2)	26 éxons, 25 íntrons, 37 kbp	17cen-q11.2 do cromossomo 17	1153 aa, 131 kDa	L09210, L24553, X73029	Macrófagos, células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais;
eNOS (NOS-3)	26 éxons, 25 íntrons, 21-22 kbp	7q35-7q36 do cromossomo 7	1203 aa, 133 kDa	M93718, M95296	Endotélio;

O óxido nítrico atua no controle fisiológico da função pulmonar e na fisiopatologia de várias doenças pulmonares como: asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (KHARITONOV et al., 2001), fibrose cística (FC), síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), bronquiectasia, doenças intersticiais pulmonares, hipertensão pulmonar (HP), e outras situações que envolvam inflamação crônica e estresse oxidativo (RICCIARDOLO et al., 2004).

Nos organismos em geral o NO atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso, desempenhando a função de defesa do hospedeiro (GÓES FILHO, 2005). Consiste em um neurotransmissor de capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, tendo por vezes ações endócrinas, autócrinas e parácrinas (FLORA-FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Além de funcionar como inibidor da adesão e agregação plaquetária, redução da aderência de leucócitos no endotélio vascular, também suprime a proliferação de células da musculatura vascular lisa por inibição de fatores de crescimento (VIARO et al., 2000).

É de grande efeito na gravidez por atuar no controle da circulação placentária e regulação das contrações uterinas no trabalho de parto (JOVANOVIC et al., 1994; SLADECK et al., 1997; MAKINO et al., 2004; SURYANARAYANA et al., 2006).

Tem importante função na imuno-regulação através da inflamação e mecanismos de autoimunidade, podendo também ter efeitos letais demonstráveis através do choque séptico (FENG e WALKER, 1993; GAZZINELLI et al., 1992).

Sabe-se que o NO é um vasodilatador da circulação pulmonar em muitos mamíferos, tendo sido proposto como um modulador do tônus vascular da estrutura da circulação pulmonar (FAGAN et al., 2001), além de atuar como regulador do tônus físico pulmonar e de manter a resistência vascular baixa nos pulmões. Ele é sintetizado localmente em células endoteliais vasculares pela (eNOS), responsável pela liberação basal de NO pulmonar (DROMA et al., 2002).

Além da eNOS que é a principal isoforma das NOS encontrada na vasculatura pulmonar (SHAUL et al., 1995), pode-se encontrar a iNOS sendo expressa no epitélio das vias aéreas, nas vias aéreas e na musculatura vascular lisa (SHERMAN et al., 1999; WATKINS et al., 1997), e a nNOS que é expressa no epitélio brônquico e no tecido nervoso dos pulmões (GUEMBE e VILLARO et al., 1999; LAMPING et al., 2000).

Comparando o óxido nítrico a outros gases, sabe-se que ele compartilha com o monóxido de carbono (CO) a característica de ligar-se ao ferro do radical heme das proteínas. Esses dois gasotransmissores compartilham muitas vias de sinalização e tem a mesma função regulatória (WU e WANG, 2005). Também podem atuar no combate a agentes patogênicos como o *Micobacterium tuberculosis* por apresentarem em seu trabalho conjunto, um efeito bactericida potencializado (KUMAR et al., 2008).

O óxido nítrico é importante também na atividade física, onde é responsável por aproximadamente 90% da vasodilatação muscular induzida pelo exercício (DIAS et al., 2011) (FIGURA 16).

Laboratorialmente, a análise do NO em amostras biológicas representa um desafio a ser vencido, uma vez que possui uma concentração mínima e por sua meia-vida extremamente curta, sendo de cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (KIECHLE & MARLINSKI, 1993; ARCHERS, 1993).

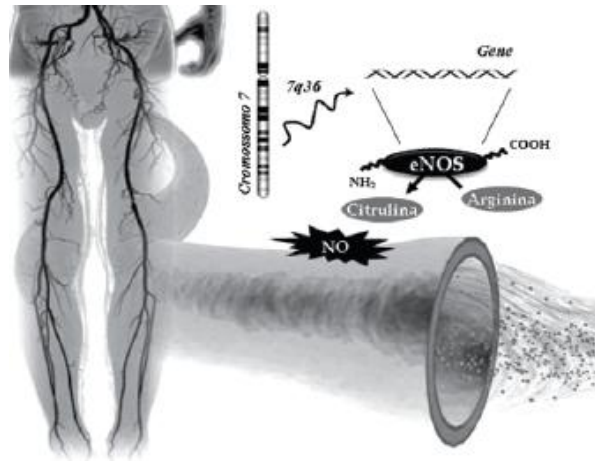


Figura 16: Esquema da expressão de eNOS e sua influencia na pressão arterial (adaptado de DIAS, 2011).

5.2 O GENE DA ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO E SEUS POLIMORFISMOS

Os genes NOS tem uma estrutura genômica semelhante, sugerindo um ancestral NOS comum (ALDERTON et al., 2001). Porém, os três genes distintos para as isoformas NOS humana, endotelial, neuronal e induzível, existem como única cópia de cada no genoma haploide humano (MARSDEN et al., 1992; NAKANE et al., 1993).

A eNOS é codificada pelo gene NOS3, constituído por 26 éxons e 25 íntrons, localizado no cromossomo 7q36.1 (FIGURA 17) e com aproximadamente 21 kb de DNA genômico (DROMA et al., 2002). Este gene codifica um RNA de 4.052 nucleotídeos (MARSDEN et al., 1992), sendo que a sua forma predominante tem 133 KDa (ALDERTON et al. 2001).

Não existe a estrutura TATA box no promotor do gene NOS3, e este apresenta-se com elementos consistentes aos genes expressos de forma constitutiva nas células endoteliais (GATA; SP1), estes elementos produzem uma resposta ao “stress por deformação” (Shear stress), entre outros como NF-1, AP-1 e AP-2 (CHAN et al., 2004; TAI et al., 2004). O promotor do gene NOS3 não se encontra numa ilha CpG, entretanto, é extremamente rico em dinucleotídeos CG e a metilação do DNA assume especial importância na regulação da expressão do gene eNOS humano (CHAN et al., 2004; BARROSO, 2009).

Na estrutura genômica da eNOS vários polimorfismos podem ser encontrados, como por exemplo, os SNPs -1468 T>A, -922 G>A e -786 T>C identificados na região promotora

(HOWARD et al., 2005), o SNP do éxon 7 (SHIN et al., 2004) e o VNTR do intron 4 (FIGURA 13) sendo que o último, é o que tem maior ênfase neste trabalho.

O polimorfismo T-786C localizado na região promotora resulta na substituição de uma timidina por uma citosina no nucleotídeo -786. Foi demonstrado que este polimorfismo altera a expressão do gene da eNOS, resultado de uma redução significativa na atividade promotora do gene (NAKAYAMA et al., 1999). Outro polimorfismo da região promotora é o SNP A-922G que consiste na mudança de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo -922, e vem sendo relacionado a infarto do miocárdio em jovens (SAMPAIO, 2005) e alterações na pressão sanguínea (KUMAR et al., 2012). No intron 4 encontra-se um polimorfismo que consiste na repetição de 27 pares de bases, os quais, dão origem a 2 alelos mais frequentes: o maior com 5 repetições in tandem (GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/G)GGGGTGAG) denominado eNOS4*B e o menor eNOS4*A com 4 repetições in tandem (FIGURA 15) (NAGASE et al., 2003; ZANCHI et al., 2000; WANG et al., 1999; YOKOYAMA et al., 1998). Também são encontrados para este polimorfismo os alelos raros eNOS4*C, eNOS4*D e eNOS4*Y que consistem em seis, três e duas repetições in tandem dos 27 pb apresentados acima respectivamente.

O alelo eNOS4*C foi encontrado em populações da República Checa (HOLLA et al., 2002), Japão (DROMA et al., 2002), Itália (BOLLI et al., 2007), Singapura (GAN & CHEN, 2012), Colômbia (SERRANO et al., 2010) e no Brasil, nos estados do Amazonas (LUIZON et al., 2009) e Rio de Janeiro (SILVA et al., 2013). O alelo eNOS4*Y foi encontrado: na Colômbia (SERRANO et al., 2010) e Brasil no estado do Rio Grande do Sul (VARGAS et al., 2005). Já o alelo eNOS4*D apresentou-se nas populações da Itália (BOLLI et al., 2007), Turquia (BAYAZIT et al., 2009) e Singapura (GAN & CHEN, 2012).

Propostas genéticas afirmam a possibilidade do polimorfismo do intron 4 atuar como um microRNA (27nt) causando inibição da expressão do gene NOS3 por mecanismos epigenéticos, em seres humanos este polimorfismo está relacionado a redução da produção de óxido nítrico – NO (ZHANG et al., 2008, 2005; PEMBERTON PREMIO, 2013).

Os polimorfismos de repetições in tandem do intron 4 estão vinculados a uma variação em níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (NOx), metabólitos estáveis do NO (TSUKADA et al., 1998), e também afetam a eficiência da transcrição em um modelo de haplótipo específico em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo T-786C da região promotora (WANG et al., 2002).

O polimorfismo no éxon 7 (G894T) é um SNP resultante da transversão de G894→T do gene da eNOS, conduzindo uma mudança do aminoácido Glutamina para Asparagina no resíduo 298 no domínio oxigenase do polipeptídio (DOSSENKO et al., 2006). Este polimorfismo tem sido associado a alterações na atividade da enzima, sendo ligado a redução da produção basal de NO, conferida pelo alelo mutante T (Asp/Asp) (TESAURO et al., 2000). É o único que resulta em uma substituição de aminoácidos na proteína (WOLFF B et al., 2005).

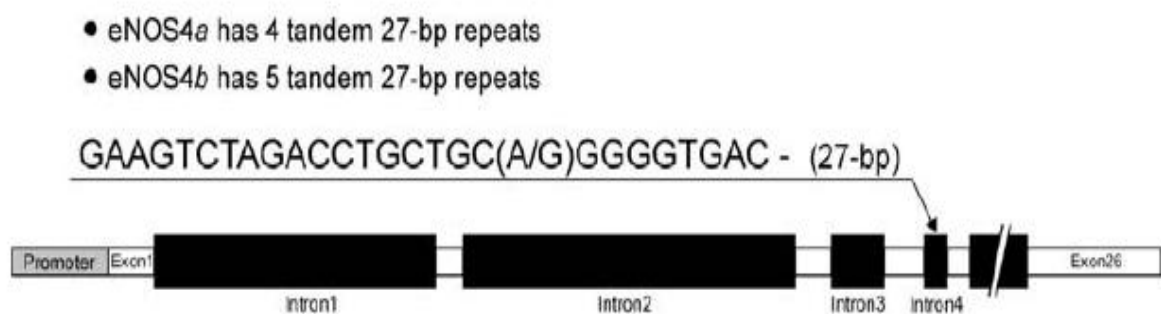


Figura 17: Cromossomo 7. Localização do polimorfismo de repetição no intron 4, representação dos dois alelos (4 repetições alelo A, 5 repetições alelo B).

Fonte: BELLINI et al., 2007

Foi sugerido nos anos de 1998 e 2000 que os polimorfismos no gene da eNOS podem alterar os níveis ou a atividade da enzima, acarretando na redução ou excesso da produção de NO, podendo contribuir para vários processos patológicos (FORSTERMANN et al., 1998; HINGORANI, 1999; WANG & WANG, 2002).

5.3 ENZIMA SINTETASE DO ÓXIDO NÍTRICO (eNOS)

A enzima sintetase do óxido nítrico - eNOS é formada por uma cadeia polipeptídica contendo 1203 aminoácidos e tem peso molecular de 135 KD (MARSDEN et al., 1993). Sua regulação ocorre em diversos níveis, que vão desde a transcrição até às modificações pós-traducionais.

A transcrição do gene NOS3 ocorre especificamente em nível de endotélio por uma regulação epigenética resultante da desmetilação do promotor, ao contrário do que é observado nas células não-endoteliais onde este se encontra altamente metilado (CHAN et al., 2004). Em nível transcricional, a expressão da eNOS é ainda regulada por ativadores específicos. A regulação positiva pode ser exemplificada pela presença de shear stress, na qual se verifica uma expressão aumentada da enzima (TOPPER et al., 1996). Pode-se constatar em alguns estudos a descrição de um elemento específico de resposta ao shear stress no promotor do NOS3 composto por uma sequência de 6 pb (NADAUD et al., 1994). Esta regulação pode acontecer também a nível pós-transcricional, onde o mRNA da eNOS é comumente bastante estável, o que se verificou ser dependente de vários elementos da região 3' não traduzida (3'UTR) formando complexos estáveis de ribonucleoproteínas (RNP).

Variados estudos sobre a formação dos complexos RNP-mRNA NOS3 sugerem a interação de várias proteínas que devem funcionar em conjunto para regular a estabilidade dos transcritos de eNOS (TAI et al., 2004).

A eNOS, juntamente com a nNOS, presente nos neurônios, é agrupada na categoria das NOS constitutivas (KNOWLES et al., 1989; BREDT e SNYDER, 1989). As NOS constitutivas produzem pequenas quantidades de NO, sendo esta produção da ordem de nano ou picomols. Sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca^{++} (MARLETTA, 1993), e está envolvida no processo de sinalização celular por transdução (DUSSE et al., 2003). Esta enzima se diferencia de sua isoforma iNOS pelo peso molecular, a forma de ativação e a capacidade de síntese de NO (MARLETTA, 1994; MONCADA et al., 1991)

A isoforma eNOS é localizada nas células endoteliais, formadoras das paredes dos vasos, sua função é catalisar e transformar o aminoácido L-arginina em óxido nítrico-NO e L-citrulina numa única reação. Sua inativação limita a contribuição do NO na homeostase dos vasos e resulta no aumento do tônus vascular e da adesão e agregação plaquetárias (VIARO et al., 2000).

Vários estudos tem sugerido que a eNOS é um importante regulador homeostático da permeabilidade microvascular, participa das interações endoteliais dos neutrófilos e manutenção da perfusão local nos pulmões, sendo também crucial nos mecanismos de defesa durante o início da inflamação (LEE et al., 2000).

5.4 A RELAÇÃO ENTRE ECA, eNOS E TUBERCULOSE PODE SER CAUSADA PELOS RADICAIS LIVRES

O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio - EROs pode causar um impacto, no interior do trato respiratório, que pode ser particularmente importante (KINNULA et al., 1995).

O pulmão é o único órgão em toda arquitetura animal, que está constantemente exposto a altas tensões de oxigênio, isso ocorre devido a grande área de sua superfície e do suprimento sanguíneo. Além disso, as células do epitélio respiratório são as primeiras a entrar em contato com agentes oxidantes inalados durante a respiração, o que torna o trato respiratório ainda mais vulnerável aos danos oxidativos provocados pelas EROs (WRIGHT et al., 1994; RAHMAN et al., 2006).

No caso da tuberculose o trato respiratório também é o primeiro local onde o *M. tuberculosis* habita no organismo dos animais, em especial na espécie humana, o que gera inflamação pulmonar local, devido a resposta imunológica do organismo ao ataque deste microrganismo. Como primeira frente de defesa ocorre a ativação dos macrófagos, e estes passam a liberar monóxido de carbono (CO) gerado pela enzima Heme oxigenase-1 (HO-1) e óxido nítrico (NO) gerado pelas enzimas eNOS, para tentar eliminar o invasor (SHILOH et al., 2008). Estes dois gases são considerados espécies reativas de oxigênio, também chamados radicais livres (WU & WANG, 2005).

No entanto, o aparelho respiratório não é afetado passivamente pelo ataque das EROs (SILVA, 2010). Pelo contrário, as células e o fluido que recobrem as vias aéreas possuem um complexo mecanismo de defesa para combater a ação desses oxidantes (WRIGHT et al., 1994). Os vários tipos celulares do trato respiratório são profundamente diferentes em sua resistência às EROs, o que pode ser parcialmente explicado pelas diferenças entre os mecanismos de defesa e/ou pelo balanço entre oxidantes e antioxidantes nesses microambientes (KINNULA et al., 1995).

Ainda não se sabe ao certo como o MTB é tão resistente as ações do sistema imune do hospedeiro, muitos mecanismos tem sido propostos para explicar como os macrófagos combatem a resistência do MTB. Estes incluem a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, acidificação dos fagossomos, fusão dos fagossomos com os lisossomos e a limitação de ferro intrafagossomal (FLESCH & KAUFMANN, 1990). Ainda é desconhecida a forma como o MTB se mantém indiferente a estes mecanismos. A hipótese inclui a invasão

dos macrófagos pelos receptores C3b através do bloqueio da produção de intermediários reativos do oxigênio (SCHLESINGER et al., 1990) produção de amônia para resistir a acidificação dos fagossomos (GORDON et al., 1980) e a inibição da fusão dos fagossomos com os lisossomos (ARMSTRONG & HART, 1971).

A angiotensina II (FIGURA 18) é um potente vasoconstritor que está envolvido na regulação fisiológica da pressão arterial sistêmica e pulmonar. O óxido nítrico executa dentre outras funções, um papel na regulação do tonus vascular pelo sistema angiotensina II. (WEINBERGER et al, 1999).

Os níveis de ECA são aumentados nos pulmões e em doenças infecciosas, como TB. Um dos papéis desta enzima é atuar como mediador na inflamação, devido ao fato de a ECA ser modulada pelo óxido nítrico, um gás fundamental no combate a agentes patogênicos como *M. tuberculosis* (ACKERMANN et al., 1998; EL SHAFEEI et al., 2011).

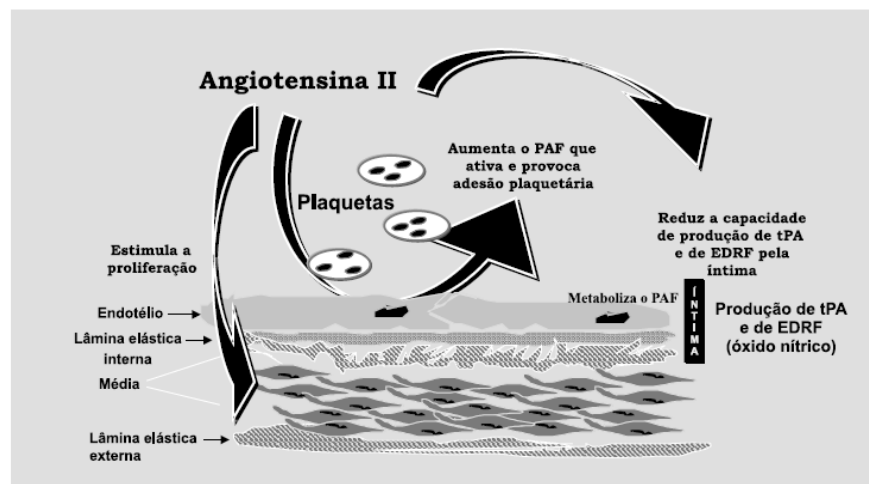


FIGURA 18: Atuação antagonista da ECA e NO sobre o endotélio.
FONTE: CESAR, 2000.

Estudos indicam que o sistema eNOS, alelos eNOS4*A está relacionado a baixa produção de óxido nítrico (MARCO, 2010; VARGAS et al., 2005; PICCOLLI, 2007) e quando de sua interação com o alelo ECA*D produz como fenótipo pessoas hipertensas, pois provoca uma considerável contração em seus vasos sanguíneos. Com relação aos problemas infecciosos no sistema respiratório, existem relatos, porém poucos, associando estes alelos a câncer pulmonar (YAREN et al., 2008), rinite alérgica (LUE et al., 2006; EL SHAFEEI et al.,

2011), a sarcoidose (PIETINALHO et al., 1999), asma (LEE et al., 2000) e tuberculose pulmonar (OGARKOV et al., 2008).

Os alelos eNOS4*B e ECA*I estão relacionados a pressão arterial normal nos indivíduos que os portam (DOSENKO et al., 2006; DENG et al., 2007; QI et al., 2006). Esta relação ocorre devido a menor produção de ECA conferida pelo alelo I, e produção de óxido nítrico em quantidades normais como expressão do alelo eNOS4*B. Contudo, não se pode afirmar com certeza que nos casos de problemas respiratórios o comportamento fenotípicos destes alelos serão benéficos como o são em casos de hipertensão, apesar de estes dois genes estarem muito relacionados ao sistema respiratório (ALVES et al., 2005; SHILOH et al., 2008), seja por sua relação com a quantidade de oxigênio produzida e o papel desta produção com relação a sobrevivência da bactéria, seja por seu papel na inflamação, ou na imunidade inata, onde pode atuar como um radical livre por ter ação nociva ao *Micobacterium*.

A hipótese dos genes candidatos ECA e eNOS4 com relação a tuberculose, é levantada em razão da ECA ser muito produzida nos pulmões, o que sugere que a mesma tem outras funções para além da produção da angiotensina II ou a inativação da bradiquinina, (DZAU, 1988), além de sua atuação na inflamação e pelo fato de o óxido nítrico ser um gás de comportamento vasodilatador e bactericida (KUMAR et al., 2008). Sendo assim, supõe-se que as diferentes combinações de alelos dos genes DCP1 e NOS3 presentes nos indivíduos podem contribuir para a susceptibilidade ou resistência à tuberculose.

Até o presente momento, não existem estudos da associação da Enzima conversora de angiotensina e da Enzima Sintetase de Oxido Nítrico em doenças pulmonares na população brasileira. Desta forma, pretende-se neste trabalho, correlacionar os polimorfismos nos genes DCP1 e NOS3 com a susceptibilidade à tuberculose em pacientes moradores do município de Porto Velho (RO).

6.0 OBJETIVOS

6.1. Geral:

Verificar a correlação entre polimorfismos encontrados nos genes DCP1 e NOS3 na determinação da susceptibilidade à tuberculose em pacientes residentes na cidade de Porto Velho (RO).

6.2. Específicos:

- 2.2.1 Verificar a presença do polimorfismo DCP1 ECA I/D, do VNTR eNOS4a/b em uma amostra de adultos não portadores de tuberculose, na população geral de Porto Velho (RO).
- 2.2.2 Verificar a presença do polimorfismo DCP1 ECA I/D, do VNTR eNOS4a/b em uma amostra de adultos portadores de tuberculose pulmonar da população de Porto Velho (RO).
- 2.2.3 Correlacionar os genótipos de ECA e eNOS e o risco de desenvolver tuberculose pulmonar.
- 2.2.4 Verificar e comparar as frequências das combinações alélicas dos pacientes e controles.

7.0 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Desenvolvimento Laboratorial:

Descrição das amostras

O universo amostral do presente trabalho constou de 185 indivíduos divididos em 2 grupos:

- a) O grupo de pacientes constou de 117 indivíduos adultos com diagnóstico de tuberculose pulmonar, de ambos os sexos, fumantes ou não, sendo que destes, 70 pacientes foram diagnosticados entre os anos de 2007 e 2008, previamente identificados por membro de nossa equipe e as 47 amostras restantes foram coletadas na Policlínica Rafael Vaz e Silva, com diagnóstico realizado entre os anos de 2010 e 2011. O sexo masculino representou 54,7% da amostra de pacientes (sexo feminino = 45,3%). A idade dos pacientes variou de 11 a 73 anos com média de 37,4 anos e desvio padrão de 15,6.
- b) Para o grupo controle, foram utilizados dados de amostras genotipadas previamente quanto aos sistemas da Enzima Sintetase do Óxido Nítrico - eNOS4 (FIORESE, 2010) e Enzima Conversora de Angiotensina - ECA provindas de indivíduos do município de Porto Velho que tiveram seus DNAs extraídos e analisados em relação a teste de identificação genética pelo laboratório de Genética do Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biologia da Universidade Federal de Rondônia (CIBEBI), coordenado pela Dra. Maria Manuela da Fonseca Moura e amostras provenientes de indivíduos voluntários, estudantes do curso de Ciências Biológicas da UNIR, que demonstraram interesse em conhecer seu genótipo para os sistemas anteriormente discriminados.

Especificamente para o sistema ECA, considerou-se ainda uma amostra composta por 75 indivíduos geneticamente não relacionados, de ambos os sexos (18,66% de homens e 81,33% de mulheres), cuja idade variou entre 2 a 71 anos (média = 30,8; dp= 13,3), fumantes ou não, que se declararam saudáveis, sem antecedentes de problemas pulmonares (asma,

pneumonia, tuberculose, bronquite, etc.), residentes na cidade de Porto Velho (RO), representados por (n=69). Tais amostras foram coletadas no Instituto Cultural de Educação Espírita André Luiz – ICEAL por acadêmicos do curso de odontologia, e foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Fernanda Borro Bijella das Faculdades Integradas Aparício Carvalho e por nós genotipadas. A inclusão desta população no grupo controle deveu-se ao fato dos indivíduos terem se autodeclarado saudáveis, com relação à doenças respiratórias, bem como por suas condições sociais serem semelhantes àquelas da amostra de pacientes. Não foi possível, por dificuldades técnicas, obter amplificação para o sistema eNOS4 para este grupo de indivíduos.

Na Tabela 2 estão sumarizadas as principais características das populações utilizadas, discriminando o sistema para as quais foram analisadas.

Tabela 2: Apresentação geral dos dados utilizados no presente trabalho, subdivididos por população, média de idade, sexo e número de indivíduos analisados por sistema.

	N	Média de idade (desvio padrão)	Feminino/Masculino	eNOS 4	ECA	Referências
Pacientes	117	37,4 (15,6)	53/64	63	91	Presente estudo
Controle CIBEBI	69	Não informado	Não informado	43	****	FIGOIRESE, 2010;
Controle ICEAL	75	30,8 (13,3)	61/14	NA	75	Presente estudo

O material biológico, para o grupo de pacientes e controles, constou de amostras de DNA de sangue venoso, coletados por punção digital. Para alguns indivíduos do grupo controle (ICEAL), amostras de células da mucosa bucal coletadas por intermédio de raspagem do epitélio bucal (“swab”), armazenadas em solução fisiológica e mantidas sob refrigeração. A coleta do material biológico foi realizada pós-assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido Pós-informacional pelos sujeitos da pesquisa.

A autorização para o desenvolvimento deste trabalho com pacientes de tuberculose deu-se pelo Conselho de ética e Pesquisa da Universidade Federal de Rondônia – UNIR através da carta 063/CEP/NUSAU de 10/12/2007. E a autorização para a utilização das amostras controle deu-se pela carta 046/2010 do Conselho de Ética e Pesquisa da FIMCA.

Extração do DNA

Utilizou-se o método de precipitação de proteínas, com pequenas modificações HIGUCHI, (1989); ALJANABI, (1997). Após a extração as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 8%, por aproximadamente 15 minutos, sendo posteriormente coradas com brometo de etídio, e observadas em transiluminador (modelo, LTB – 20X20 HE) sob luz UVB de 302 nm de comprimento de onda, para verificar a presença e integridade do DNA. Após isso, procedeu-se a quantificação em espectrofotômetro de massa (modelo Nicolet Evolution, E-100, Marca Thermo Eléctron Corporation) sob os comprimentos de onda de 260nm (DNA) e 280nm (proteínas) para verificação da pureza do material.

Análise dos sistemas genéticos

Todos os indivíduos do grupo de pacientes que tiveram amostra biológica coletada, bem como alguns indivíduos participantes do grupo controle, foram genotipados, segundo as técnicas descritas na literatura especializada quanto aos alelos dos genes da Enzima Conversora de Angiotensina (sistema ECA) e da Enzima Sintetase do Óxido Nítrico (sistema eNOS), os pacientes com TB foram cuidadosamente examinados no Posto de Saúde Rafael Vaz e Silva e tiveram seu diagnóstico confirmado através do exame de prova tuberculínica – PT, Raio-x do tórax e em alguns casos baciloscopia.

Reação em Cadeia de Polimerase:

Para a amplificação do DNA-alvo utilizou-se a técnica de PCR no Termociclador PT100-MJResearch. Sequencia dos iniciadores utilizados que flanqueiam os pares de bases dos sistemas eNOS, íntron 4, e ECA seguem relacionados abaixo no quadro 2:

Gene	Primer	Sequencia (5' to 3')	Produto (Pb)	Temp. de Pareamento	Alelos	Referências
eNOS Intron 4	3'-5'	AGG CCC TAT GGT AGT GCC TTT TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC	390 420	52° C	A B	MARRONI et al., 2006
ECA	3' - 5'	CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T	190 490	64°C	D I	RIGAT et al., 1990

Quadro 2- Sequências de *Primers* sense e antisense, tamanhos dos produtos amplificados e temperaturas de pareamento utilizados na PCR, especificados por sistema genético.

Após a amplificação procedeu-se a separação eletroforética dos amplicons em gel de Poliacrilamida (8%) a qual teve duração de três horas e meia. Para esta corrida, utilizou-se a tensão de 180V, a uma corrente de 40 A e potência de 80W, obtendo-se uma velocidade de 8V/cm. Para a visualização das bandas e consequente discriminação dos genótipos, o gel foi fixado por 10 minutos em solução fixadora (Ácido acético 99,7%), sendo, seguido de lavagens em água corrente. Em seguida o gel permaneceu imerso por 10 minutos em solução de nitrato de prata (2%), e, posteriormente, foi lavado rapidamente em água corrente e submetido a um banho com agitação, por cerca de 1 minuto, em solução reveladora (NaOH), acrescida de 1ml de formaldeído. Após a revelação das bandas a coloração foi bloqueada com solução fixadora.

Genotipagem do polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina – ECA:

Para a formação do mix da PCR do gene da ECA utilizou-se um volume final de 12,69µl, contendo 2µl de DNA genômico, 2,5µM de iniciadores, 100µM de dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase e 3µM de MgCl₂.

As condições de amplificação para o gene da ECA foram um ciclo inicial de desnaturação a 95° C por 1 min, seguido de 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C por 1 min, pareamento dos iniciadores a 64°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Para finalizar o processo de amplificação foi realizada uma ultima etapa de extensão de 72° C por 10 min.

Os alelos da ECA foram visualizados com fragmentos de 490pb para o alelo (I) e 190 pb para o alelo (D). Para comparação utilizou-se um padrão de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Genotipagem dos polimorfismos da eNOS intron 4:

Para a reação utilizou-se um volume final de 12,5µl, contendo 2µl de DNA genômico, 2,5µM de iniciadores específicos para o polimorfismo em questão, 100µM de dNTP , 1 unidade de *Taq* DNA Polimerase e 2,0mM de MgCl₂. Os ciclos de PCR foram específicos para cada par de iniciadores.

As amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de desnaturação por 1 minuto a 94°C; pareamento por 1 minuto a 52°C. A extensão deu-se por 1 minuto a 72°C e o final da extensão por 10 minutos a 72°C.

Os alelos do polimorfismo do intron 4 da eNOS foram visualizados como fragmentos de 390 pb para o alelo (eNOS*A) e 420 pb para o alelo (eNOS*B).

7.2 Análises genéticas

Os cálculos de frequências gênicas e genotípicas foram realizados com o auxílio dos programas GENEPOP versão 4.1 (http://genepop.curtin.edu.au/help_input.html) (RAYMOND & ROUSSET) e GENIOC (CABELLO & KRIEGER, 1997). Para as análises genotípicas e alélicas de associação foi utilizado o teste de Qui-quadrado de Pearson, com respectivos graus de liberdade também no GENIOC. Para análise das combinações genéticas o programa utilizado foi o BioEstat 5.0 e as análises em tabelas de contingencia com χ^2 das populações de pacientes e controles foram feitas online (<http://www.physics.csbsju.edu>). Para os testes de intervalo de confiança o programa utilizado foi o Excel versão 2010.

8.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 Das amostras analisadas

Dos indivíduos do grupo de pacientes coletados no ano de 2011, 23 informaram ter tomado a vacina BCG, 16 negaram ter sido vacinados e 8 deles não sabiam dizer nada sobre a vacina, alguns até desconheciam a mesma. Os indivíduos coletados durante os anos de 2009 e 2010 não foram questionados quanto à vacinação para BCG.

Em relação ao tipo de tuberculose, do total de 117 pacientes amostrados, 88,07% eram portadores de tuberculose do tipo pulmonar, sendo os 11,93% restantes portadores de outras formas menos frequentes (TABELA 3).

Tabela 3: Estratificação dos pacientes amostrados segundo o tipo de tuberculose apresentada.

TIPOS DE TUBERCULOSE	N	PORCENTAGEM
TB PULMONAR	103	88,07 %
TB PLEURAL	5	4,27%
ILTB	3	2,56%
TB GANGLIONAR	1	0,85%
TB PLEURAL + PULMONAR	1	0,85%
TB OCULAR	1	0,85%
TB PERITÔNIO	1	0,85%
TB EXTRA- PULMONAR	1	0,85%
TB MENÍNGEA	1	0,85%
TOTAL	117	100%

Com relação à etnia, nosso grupo amostral auto declarou-se da seguinte forma:

- ✓ 51 caucasianos (sendo 33 homens e 18 mulheres);
- ✓ 3 índios (sendo 1 homem e 2 mulheres);
- ✓ 26 negros (dos quais 8 homens e 18 mulheres);
- ✓ 37 outros (destes 22 homens e 15 mulheres) conforme ilustrado no GRÁFICO 1.

Observa-se no gráfico abaixo a predominância do sexo feminino nas etnias de índios, negros e a população masculina predominou nas demais etnias (GRÁFICO 1).

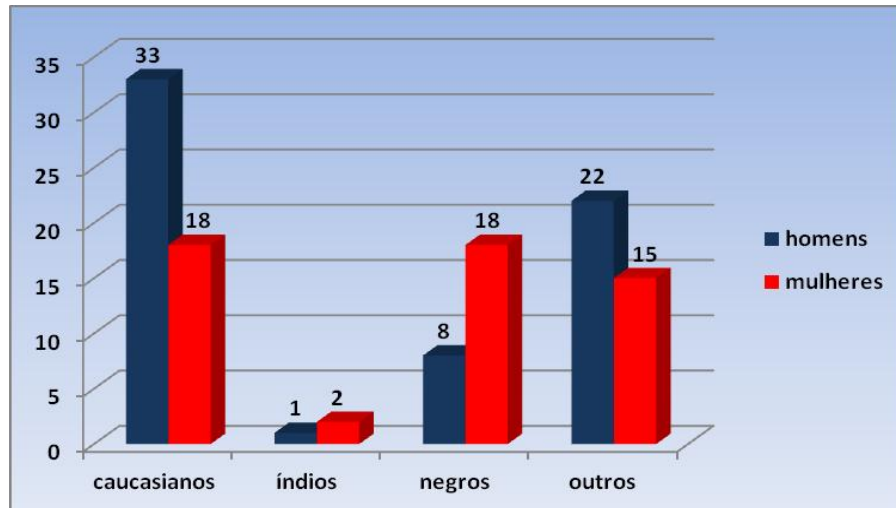


Gráfico 1: Estratificação da amostra de pacientes com tuberculose por sexo e etnia.

8.2 O sistema ECA

O polimorfismo da ECA foi escolhido para uma possível associação com a tuberculose devido a sua relação com a inflamação, como também, por sua atividade vasoconstritora conferida pelo alelo ECA*D, com isto é possível que ocorra uma redução na disponibilidade de oxigênio dos pulmões, local onde o *M. tuberculosis* costuma se fixar (SEISCENTO et al., 2006). Uma vez que este tipo de parasita tenha maior afinidade por áreas mais oxigenadas (GOMES, 2007), supõe-se que pessoas portadoras do polimorfismo ECA*D possam de alguma forma dificultar a sobrevivência do parasita no organismo humano. As amplificações para o sistema ECA podem ser verificadas na FIGURA 19.

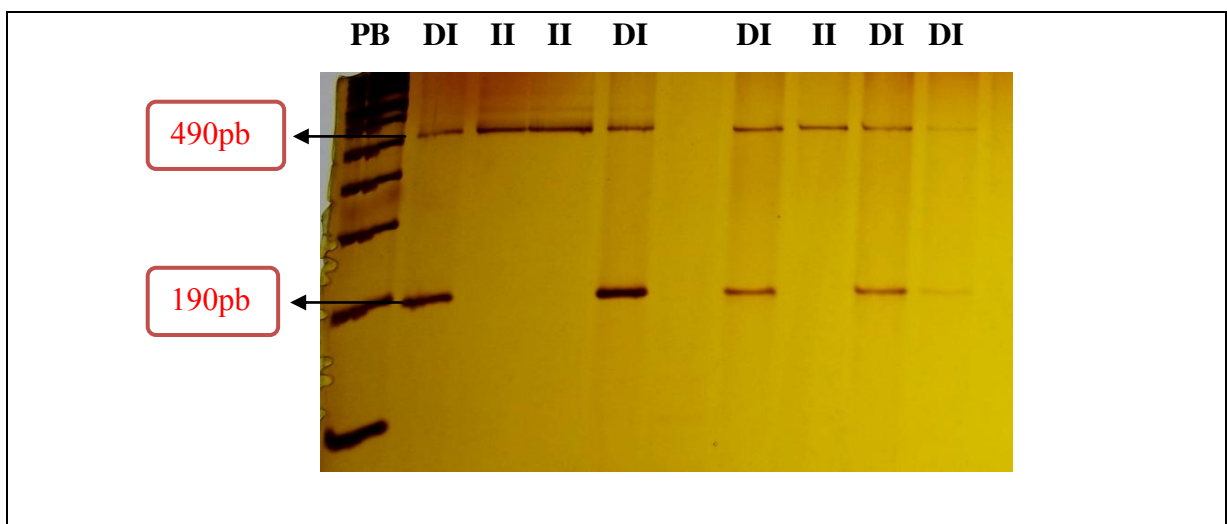


Figura 19: Gel de Poliacrilamida 8% com amplificações para os alelos ECA*D (190pb) e ECA*I (490pb) e genótipos observados.

As frequências encontradas para o grupo de pacientes foram de 0,626 (57) para o genótipo DD, 0,297 (27) para o genótipo DI e 0,0769 (7) para II, com IC 95% entre 0,714 – 0,835 e entre 0,165 – 0,286 para os alelos ECA*D e ECA*I, respectivamente. Nas amostras controle, provenientes do ICEAL, as frequências genotípicas encontradas foram 0,64 (48) para homozigotos DD e, 0,36 (27) para heterozigotos DI. Nesta amostra populacional não foram encontrados indivíduos do genótipo II. O IC (95%) para tais controles em relação aos alelos ECA*D e ECA*I foram, respectivamente, 0,759 – 0,881 e 0,118 – 0,241 (TABELA 4).

Tabela 4: Frequências genotípicas, observadas e esperadas, e frequências alélicas do polimorfismo genético ECA nas amostras populacionais de pacientes com tuberculose e controles da cidade de Porto Velho – RO.

Polimorfismos ECA*D / ECA*I						
Frequências				χ ² (p)	Frequências	
Genótípicas (Observado/Esperado)					Alélicas	
Controle ICEAL	DD	DI	II		ECA*D (IC 95 %)	ECA*I (IC95 %)
	0,640 (48 /47,4)	0,360 (27 / 24,4)	0 (0 / 3,16)		3,613 (0,057)	0,8200 (0,76 - 0,88)
Pacientes	0,626 (57 / 57,6)	0,298 (27 / 29,6)	0,076 (7 / 3,84)	2,047 (0,152)	0,7747 (0,71 - 0,83)	0,2253 (0,16 - 0,28)

As frequências alélicas corresponderam, respectivamente, nos indivíduos do grupo de pacientes e controle, a 0,7747 e 0,8200 para ECA*D e 0,2253 e 0,1800 para ECA*I (TABELA 4; GRÁFICO 2).

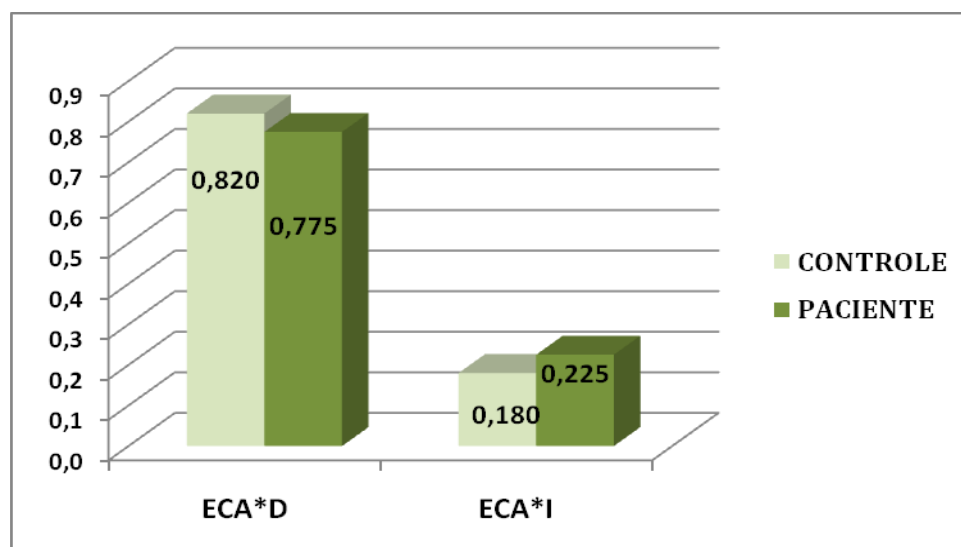


Gráfico 2: Comparação das frequências alélicas, ECA*D e ECA*I, observadas em pacientes com tuberculose e amostra controle, na população de Porto Velho – RO

As populações de indivíduos controles (ICEAL) e pacientes com TB, apresentadas acima, estão individualmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com os valores de qui-quadrado e p apresentados na tabela 4. Entretanto, a comparação entre tais populações, por $\chi^2_{\text{contingência}}$ (TABELA 5), evidenciou que há uma diferença estatisticamente significativa entre a amostra populacional de pacientes e controles agrupados ($\chi^2_2 = 6,29$; $p=0,043$).

Tabela 5: Análise comparativa por tabela de contingência (χ^2 e p) entre frequências alélicas do sistema ECA em pacientes com teste positivo para *M. tuberculosis* e população controle, onde N é o número total de alelos amostrados por população.

População	Alelo		N	χ^2	Gl	p
	ECA*D	ECA*I				
Pacientes	0,7747	0,2253	182	6,29	2	0,043*
Controles	0,8200	0,1800	150			

*significante ao nível de 5%

Quando realizamos o cálculo do risco relativo (WOLF, 1955) para indivíduos portadores do alelo ECA*D desenvolver tuberculose em relação à população controle, encontramos que a presença do alelo ECA*D deve conferir resistência ao MTB (Risco relativo $X = 0,07$; IC (95%) $0,01 < X < 0,61$; $p=0,016$).

Considerando que hipertensão e diabetes são duas patologias amplamente associadas à ECA, e, na busca de eliminar possíveis fatores que venham a influenciar um resultado falso positivo, excluímos de ambas as amostras todos os indivíduos que declararam ter hipertensão e/ou diabetes. Desta forma, passamos a nomear a amostra de pacientes com tuberculose por “pacientes com tuberculose sem comorbidades” (TB SC) e, os controles ICEAL por controles “saúdáveis” e realizamos novamente os testes acima descritos, análise de contingência (TABELA 6; GRAFICO 3) e cálculo do risco relativo. Novamente, os resultados indicam uma proteção conferida pelo alelo ECA*D em relação a tuberculose (Risco Relativo (X) = $0,07$; IC (95%) $0,01 < X < 0,63$; $p = 0,017$).

Tabela 6: Análise comparativa por tabela de contingência (χ^2 e p) entre frequências alélicas do sistema ECA em pacientes com teste positivo para *M. tuberculosis* sem outras comorbidades (TB SC) e amostra da população controle “saúdável” (controle s), onde N é o número total de alelos amostrados por população.

População	Alelo		N	χ^2	Gl	p
	ECA*D	ECA*I				
TB SC	0,684	0,316	76	6,50	2	0,039*
Controle s	0,806	0,194	108			

*significante ao nível de 5%

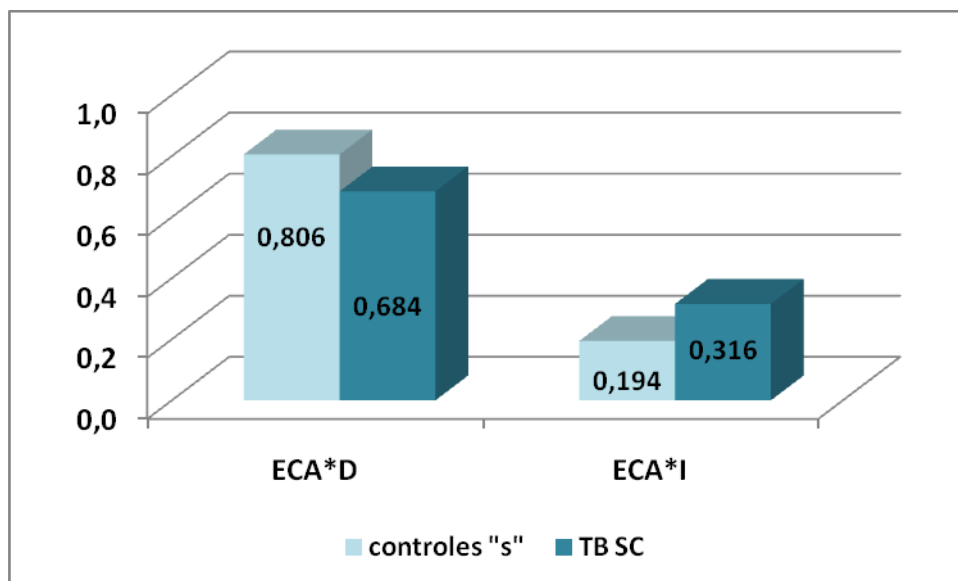


Gráfico 3: Comparação das frequências alélicas, ECA*D e ECA*I, observadas em pacientes com tuberculose sem comorbidades (TBSC) e amostra de controle “saudável” (controle “s”), na população de Porto Velho – RO

Nossos achados indicam que a presença do alelo ECA*D confere certa resistência contra tuberculose (Risco relativo $X = 0,07$). Esta associação pode ser explicada fisiologicamente pelo fato do referido alelo ser amplamente associado com níveis pressóricos elevados, devido ao aumento da contração dos vasos sanguíneos (HARRAP et al., 1993; ARAÚJO, 2010; HAHNTOW et al., 2010; MIRANDA-VILELA et al., 2010; RAMU et al., 2011). Uma vez que a ECA é altamente expressa nos pulmões (ACKERMANN et al., 1998; PULLA REDDY et al., 2010; EL SHAFFEI et al., 2011; LIMA, 2011; BONFIM-SILVA & RIOS, 2012), nos microcapilares deste órgão o aumento da contração das paredes vasculares provoca uma consequente baixa na tensão de O_2 , que é causada pela diminuição do fluxo sanguíneo (DIAS et al., 2007; DIAS et al., 2009). O MTB tem menor taxa de desenvolvimento em condições de hipóxia (GOMES, 2007; DE PAULA et al., 2005). Desta forma, indivíduos portadores do alelo ECA*D, responsável pelo aumento da expressão de ECA e, consequentemente, da maior contração dos vasos, oferecem ao MTB um ambiente hostil para sua sobrevivência, fazendo com que possa ativar o sistema imunológico, através da inflamação (ANDERSSON & PERSSON, 1994), ou causar a latência do parasita (ROBERTS et al., 2004; KUMAR et al., 2007; KUMAR et al., 2008), o que pode explicar o fato de alguns pacientes apresentarem a prova tuberculínica reativa mas não desenvolverem a infecção (HENN, 2002). Entretanto, quando analisamos as frequências alélicas, levando em conta o

intervalo de confiança (IC) de 95% (GRAFICO 4) a flutuação possível nas mesmas, demonstra que o limite inferior da amostra controle está inserido dentro da variação possível na amostra de pacientes, enquanto o limite superior obtido para a população de pacientes é inferior ao limite superior da amostra controle. Podemos sugerir, por tais resultados que há necessidade de ampliar ambas as populações de maneira a reduzir a amplitude do IC nas amostras, o que poderia reforçar a diferença entre as populações e, conseqüentemente reafirmar com maior propriedade as tendências assinaladas pelo risco relativo.

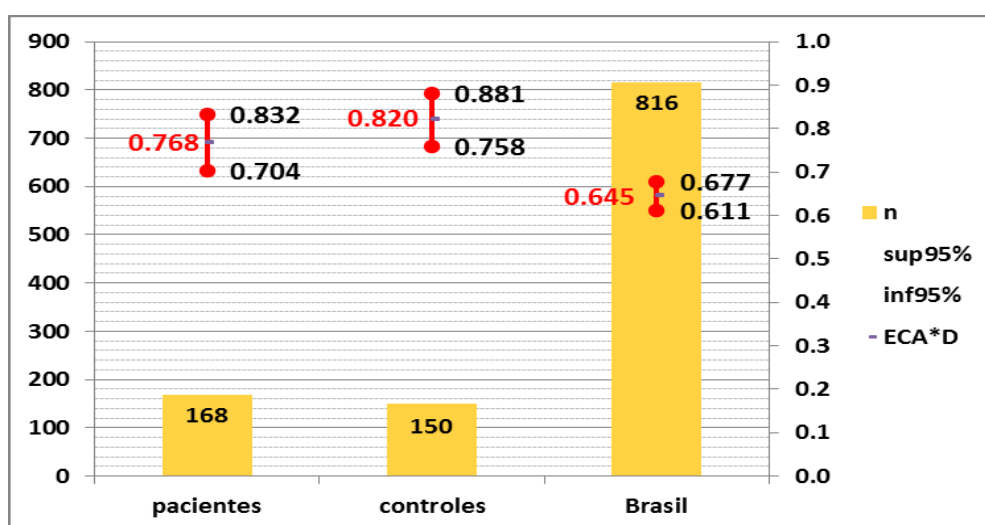


Gráfico 4: Comparação entre os intervalos de confiança (95%) para o alelo ECA*D nas amostras populacionais de pacientes com tuberculose, controle (Porto Velho- RO) e população brasileira (média ponderada) para o sistema ECA. A escala apresentada ao lado esquerdo do gráfico contempla a escala para o universo amostral, enquanto que na escala ao lado direito são representadas as frequências.

A tabela 7 apresenta as frequências alélicas para o sistema ECA em diversas populações mundiais, comparando-as a população controle apresentada no presente estudo. Considerando as populações brasileiras passíveis de agrupamento, pela análise do χ^2 heterogeneidade, foram obtidas frequências médias ponderadas para os alelos ECA*D e ECA*I de, respectivamente, 0,645 e 0,355. O intervalo de confiança (IC) de 95%, observado nesta população brasileira, para o alelo ECA*D correspondeu aos valores mínimos e máximos de 0,611 – 0,677. Quando da comparação destes valores com os resultados encontrados neste trabalho, tanto para a população controle quanto para a população de pacientes, verifica-se que as duas populações estão fora dos limites alcançados pelas frequências médias da população brasileira, demonstrando que nossos resultados apresentaram diferenças com os dos estudos publicados (GRAFICO 4).

Um dos fatores que podem estar contribuindo para a referida diferença é o tamanho amostral pequeno analisado até o momento para a população de Porto Velho. Além deste, este achado pode ser devido a contribuição ancestral da população. Para se confirmar os dados aqui relatados, faz-se necessário uma ampliação do espaço amostral.

Neste trabalho nenhum cálculo foi feito para verificar a existência da correlação entre genótipos da ECA entre os sexos masculino e feminino, uma vez que as proporções sexuais (sexo masculino: sexo feminino) em cada genótipo são semelhantes às aquelas obtidas na população total (razão ~ 1,2). Relacionados a ECA e desvio na proporção sexual, Landazuri et al., (2008) trabalhando com crianças e adolescentes de 8 a 18 anos observou que os valores médios da enzima foram mais elevados entre os meninos, do que em meninas antes da puberdade, e que enquanto nas meninas os níveis séricos desta enzima diminuía com a idade, nos meninos ocorria o contrário. Também foi verificado no mesmo trabalho uma possível influência dos hormônios gonadais na pressão arterial das meninas, já que após iniciada a puberdade os níveis da ECA ocorriam mais elevados nas mesmas do que nos meninos de mesma idade. Os dados encontrados no trabalho de Landazuri corroboram com as observações feitas em modelos animais por Gallagher et al (1999) e Freshour et al (2003), estando também de acordo com os achados de Shankar et al (2005) acerca da influência dos hormônios sexuais na expressividade dos alelos da ECA entre homens e mulheres.

Na tabela 7 apresentamos um levantamento de frequências obtidas na literatura. De uma forma geral, as frequências apresentadas por nossa população controle mostraram-se dentro dos mesmos padrões encontrados na maioria das populações da América do Norte, (O'DONNELL et al., 1998; ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK et al., 2008), América do Sul – Brasil (MARTINS, 2011; FREITAS, 2006; INÁCIO et al., 2004; ALMADA et al., 2010), Europa (CAMÓS et al., 2012; ELENÍ et al., 2008; VILLAR et al., 2008; TIRET et al., 1992) e Eurásia (AGACHAN et al., 2003; NACAK et al., 2010; YAREN et al., 2008), tendo o alelo ECA*D frequência superior a exibida pelo alelo ECA*I.

As frequências de nosso trabalho para população controle se apresentaram com tendência diversa da encontrada nas populações controle no continente Asiático (LUE et al., 2006; DING, 2008; LU et al., 2011; GAO et al., 2012) e Africano (ELSHAMAA et al., 2011), devido a uma inversão das frequências do alelo ECA*I, que se apresentaram valores superiores do que as do alelo ECA*D. Essa mesma inversão foi também observada, de forma pontual, na América do Norte (BAJWA et al., 2011), América do Sul (FREITAS et al., 2007;

MEYERFREUND, 2006) e Europa (ZAK et al., 2003; RIGOLI et al., 2004; OGARKOV et al., 2008).

Tabela 7: Frequência (%) dos alelos ECA*D e ECA*I distribuídos por região geográfica dos indivíduos controles de publicações científicas e do presente estudo

CONTINENTE	POPULAÇÃO	N	DD	DI	II	D	I	REFERENCIAS
	EUA	793	120	347	326	0,3701	0,6299	BAJWA et al., 2011
<u>AMÉRICA DO NORTE</u>	Canadá	110	45	47	18	0,6227	0,3773	ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK et al., 2008
	EUA	27	9	9	9	0,5000	0,5000	MURPHEY et al., 2000
		170						
	EUA	2	484	882	336	0,5435	0,4565	O'DONNEL et al., 1998
	Brasil- RO	75	48	27	0	0,8200	0,1800	PRESENTE ESTUDO
	Brasil – RO	69	42	25	2	0,7899	0,2101	MARTINS, 2011
	Brasil – AM* ⁺	78	4	13	61	0,1346	0,8654	FREITAS et al., 2007
	Brasil - Centro oeste	15	6	7	2	0,6333	0,3667	INÁCIO et al., 2004
								MIRANDA-VILELA et al., 2010
	Brasil – DF*	48	21	21	11	0,6563	0,3438	
	Brasil - ES	61	15	41	5	0,5820	0,4180	ALMADA et al., 2010
	Brasil - ES ⁺	60	234	26	32	0,2560	0,7440	MEYERFREUND, 2006
	Brasil - ES ⁺	496	52	218	217	0,3250	0,6750	MEYERFREUND, 2006
<u>AMÉRICA DO SUL</u>	Brasil - ES	114	27	55	30	0,4780	0,5220	MEYERFREUND, 2006
	Brasil - MG	20	7	12	1	0,6500	0,3500	VELLOSO et al., 2007
	Brasil - Nordeste	58	23	27	8	0,6293	0,3707	INÁCIO et al., 2004
	Brasil - Norte	15	5	6	4	0,5333	0,4667	INÁCIO et al., 2004
	Brasil - RJ	115	51	52	12	0,6696	0,3304	FREITAS, 2006
	Brasil - SP	70	20	37	13	0,5500	0,4500	MARSON et al., 2012
	Brasil – Sudeste*	92	28	43	21	0,5380	0,4620	INÁCIO et al., 2004
	Brasil – Sul*	30	16	7	7	0,6500	0,3500	INÁCIO et al., 2004
	Brasileiros * [#]	221	70	106	30	0,5566	0,4434	ARAÚJO et al., 2010
<u>ÁFRICANO</u>	Egito	70	11	21	38	0,3071	0,6929	ELSHAMAA et al., 2011
	África do Sul	282	66	147	59	0,4947	0,5053	COLLINS et al., 2004
	África do Sul	191	85	87	19	0,6728	0,3272	PAYNE et al. 2007
	Jamaica	500	180	235	85	0,5950	0,4050	ROTIMI et al., 1996
	Nigéria	135	42	63	30	0,5444	0,4556	ROTIMI et al., 1996
	Alemanha	200	55	106	39	0,5400	0,4600	ADAMZIK et al., 2007
	Alemanha	158	50	69	39	0,5348	0,4652	PABST et al., 2009
	Austria	118	31	68	19	0,5508	0,4492	TKACOVÁ et al., 2005
	Croácia	353	98	177	78	0,5283	0,4717	PAVLIC et al., 2012
	Eslovénia	404	130	198	76	0,5668	0,4332	GLAVNIK et al., 2007
<u>EUROPEU</u>	Espanha	147	54	63	30	0,5816	0,4184	CAMÓS et al., 2012
	Espanha	364	152	155	57	0,6305	0,3695	VILLAR et al., 2008
	França	346	118	152	76	0,5607	0,4393	MARRE et al., 1997
	França	196	60	103	33	0,5689	0,4311	TIRET et al., 1992
	Grécia	352	128	178	46	0,6165	0,3835	ELENI et al., 2008
	Inglaterra	190						
	(homens)	6	498	949	459	0,5102	0,4898	MARSHALL et al., 2002

CONTINENTE	POPULAÇÃO	N	DD	DI	II	D	I	REFERENCIAS
	Itália	92 601	20	48	24	0,4783	0,5217	RIGOLI et al., 2004 VAN DER KNAAP et al., 2008
	Netherlands	5	1677	3006	1332	0,5287	0,4713	ZAK et al., 2003
	Polônia	111	24	48	39	0,4324	0,5676	PARENICA et al., 2010
	República Checa	200	56	101	43	0,5325	0,4675	OGARKOV et al., 2008
	Rússia	208	41	105	62	0,4495	0,5505	NAZAROV et al., 2001
	Rússia	449	109	235	105	0,5045	0,4955	AGACHAN et al., 2003
	Turquia	86	36	32	17	0,6047	0,3953	NACAK et al., 2010
<u>EURO-ASIÁTICO</u>	Turquia	165	64	72	29	0,6061	0,3939	YAREN et al., 2007
	Turquia	85	34	37	14	0,6176	0,3824	CHAN et al., 2005
	Turquia	85	34	37	14	0,6176	0,3824	DING, 2008
<u>ASIÁTICO</u>	China	326	43	133	150	0,3359	0,6641	GAO et al., 2012
	China	33	4	10	19	0,2727	0,7273	LU et al., 2011
	China	602	29	253	320	0,2583	0,7417	WANG et al., 1999
	China	236	23	105	108	0,3199	0,6801	ZHANG et al., 2005
	China	38	7	18	13	0,4211	0,5789	CHEON et al., 2000
	China	54	4	30	20	0,3519	0,6481	LEE et al., 2000
	Coreia	121	23	50	48	0,3967	0,6033	HIGAKI et al., 2000
	Sul da Coreia	121	23	50	48	0,3967	0,6033	JAYAPALAN et al., 2010
		381						
	Japão	4	468	1708	1638	0,3466	0,6534	BORAH et al. 2011
	Malásia	137	20	56	61	0,3504	0,6496	RAMU et al., 2011
	Nordeste da Índia	812	101	366	345	0,3498	0,6502	LUE et al., 2006
	Sul da Índia	444	101	190	153	0,4414	0,5586	
	Taiwan	102	4	42	56	0,2451	0,7549	

*Populações não passíveis de serem agrupadas a média ponderada brasileira por apresentarem X^2 heterogeneidade cujos p foram significantes ao nível de 5%.

população de brasileiros afrodescendentes

+ população indígena

De todos os trabalhos relacionados na tabela 7, o presente trabalho foi o que apresentou maior frequência para o alelo ECA*D. A menor frequência encontrada para o mesmo alelo também foi encontrada em uma população brasileira por FREITAS et al., (2007) com valor de 0,1346 no município de Santa Isabel do Rio Negro-AM. Esta população é predominantemente de descendentes de índios, sendo que alguns até mesmo residem na aldeia indígena Yanomami. Como consequência do fato do alelo ECA*D ter se apresentado menos frequente no estudo citado, o alelo ECA*I apresentou uma alta frequência, o que demonstra uma inversão nos valores das frequências para o polimorfismo ECAD*/ECA*I das encontradas em populações não indígenas brasileiras, fazendo com que as frequências de FREITAS et al., (2007) somente sejam comparáveis aos estudos de Meyerfreund, (2006), que também analisou o polimorfismo da ECA em populações mestiças e predominantemente indígenas (Tupiniquins e Guaranis), no estado do Espírito Santo. Vale ressaltar que as

frequências indígenas brasileiras são visualmente semelhantes às encontradas nas populações Asiáticas (LUE et al., 2006; DING, 2008; LU et al., 2011; GAO et al., 2012), o que remete ao fato de que as teorias de migração populacionais, sugerem que as populações asiáticas podem representar os ancestrais dos indígenas americanos (BEIGUELMAN, 2008; BELTRAME, 2008; SALZANO & HUTZ, 2005; SEOANE, 2007).

Avaliando os IC (95%) calculados após os devidos testes de χ^2 de heterogeneidade (GRÁFICO 5) entre as populações apresentadas (TABELA 7) os quais representam as populações controles separadas por regiões geográficas, percebe-se que o presente trabalho foi o que apresentou a frequência ECA*D mais alta 0,8200, seguido pela população brasileira 0,6446, África 0,5567 e Europa 0,5357 que apresentaram as frequências mais próximas entre si, e América do Norte 0,4885 e Ásia 0,3571 que apresentaram as menores frequências para este alelo (TABELA 8). Pode-se verificar que a maior amplitude encontrada para o IC (95%) foi a do presente trabalho e que as amplitudes entre os ICs das populações do Brasil, América do Norte, Europa, Ásia e África foram muito pequenos, demonstrando que as frequências do alelo ECA*D são pouco variáveis para essas populações.

Com relação as frequências encontradas nos estudos de populações Africanas, as que mais se destacaram, foram as encontradas por Al-Hinai et al (2002) com valores para ECA*D e ECA*I de respectivamente 0,7137 e 0,2863 as quais ainda são menores que as frequências encontradas neste trabalho.

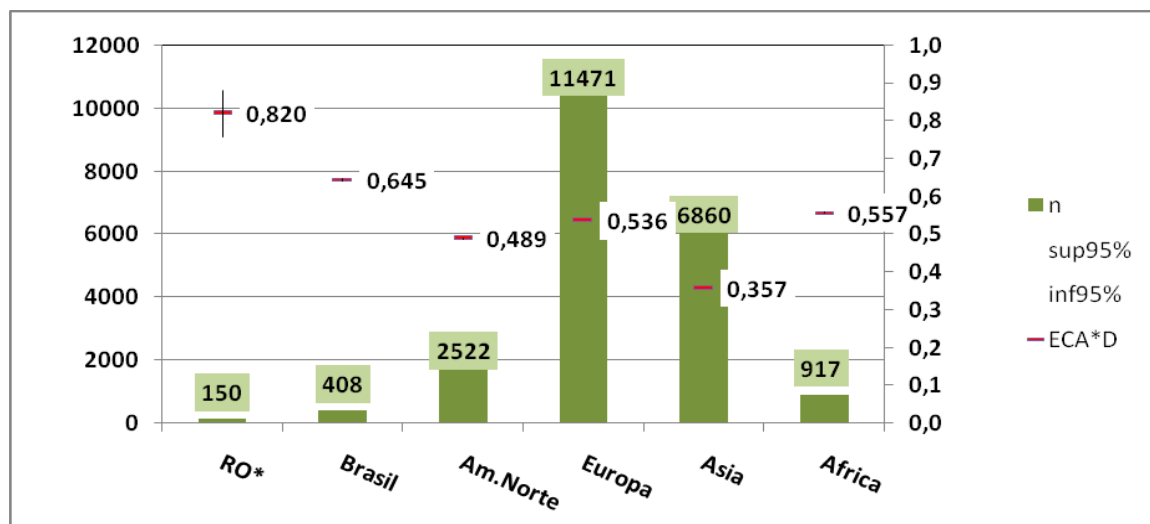


Gráfico 5: Frequências médias ponderadas, por regiões, de ECA*D em populações controles, e respectivos IC 95% superior e inferior. Em barras são apresentadas o número de indivíduos analisados por população.

Tabela 8: Frequências alélicas ECA*D apresentada nas populações distribuídas por regiões geográficas

ECA*D	RO*	Brasil	Am.Norte	Europa	Ásia	África
n	150	408	2522	11471	6860	917
IC sup 95%	0,8810	0,6469	0,4889	0,5358	0,3572	0,5578
IC inf 95%	0,7580	0,6423	0,4881	0,5356	0,3569	0,5556
ECA*D	0,8200	0,6446	0,4885	0,5357	0,3571	0,5567

Dentre todas as populações de pacientes com diversas patologias, amostradas na tabela 9, nossa população foi a que teve frequência de alelo ECA*D mais alta 0,7747, seguida por 0,7202 (AGACHAN et al., 2003). A frequência mais baixa (ECA*I=0,2622) encontrada para este alelo foi também relatada por FREITAS et al., (2007), em um estudo que avaliou a contribuição de seis polimorfismos genéticos presentes nos genes do sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA) aos fatores de riscos clínicos para o desenvolvimento da hipertensão arterial essencial de hipertensão em indígenas do Amazonas.

Quando comparamos nossa população de pacientes com as demais amostradas na tabela 8, a frequência do alelo ECA*D se apresentou mais alta que a do alelo ECA*I na maioria das populações divididas por regiões, sendo assim, tem-se para América do Sul – Brasil, nos estados de São Paulo 0,6333 (MARSON et al., 2012), Bahia 0,5980 (ARAÚJO, 2010;), Rio de Janeiro 0,5849 (FREITAS, 2006), Espírito Santo 0,5658 (PEREIRA et al., 2003) e Distrito Federal 0,5417 / 0,5266 (MIRANDA-VILELA et al., 2010; MORAES, 2008), Europa (HARRAP et al., 1993; GLAVNIK et al., 2007; PAVLIC et al., 2012; VILLAR et al., 2008; MARSHALL et al., 2002; PLUNKETT et al., 2008), Eurásia (AGACHAN et al., 2003; YAREN et al., 2007 e NACAK et al., 2010) e pontualmente na Ásia pelos trabalhos de (WANG et al., 1999; RAMU et al., 2011) sendo sua representação na América do Norte conferida pelos estudos de O'DONNELL et al., (1998) e ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK et al., (2008). Observa-se que alguns trabalhos de populações Norte Americanas apresentaram as frequências pontualmente invertidas (BAJWA et al., 2011 e VIGANO et al., 2009), na América do Sul (FREITAS et al., 2007) e na Europa (PABST et al., 2009 e OGARKOV et al., 2008), demonstrando as frequências alélicas para ECA*I mais altas que para as do alelo ECA*D. Essa inversão é bem caracterizada pela análise das populações Asiáticas, onde a maioria dos trabalhos lá realizados apresentam esta característica.

Quando da comparação entre as populações controle (TABELA 7) e de pacientes (TABELA 9) observa-se dois tipos de comportamento para os alelos da ECA com relação às patologias descritas relacionadas ao sistema respiratório ou aos órgãos ligados a ele:

Nos estudos onde o alelo ECA*D foi sugerido por conferir certa proteção em relação à patologia estudada, como os trabalhos de tuberculose realizados aqui e na Rússia (OGARKOV et al., 2008), de DPOC realizados na Alemanha (PASBT et al., 2009; TKACOVÁ et al., 2005), de síndrome da angustia respiratória aguda realizada também na Alemanha (ADAMZIK et al., 2007) e a associação com risco de câncer no pulmão realizado na China (NACAK et al., 2010) demonstraram que a patologia poderá estar associada a uma susceptibilidade causada pelo alelo ECA*I, de forma que a tendência do alelo ECA*D é se apresentar mais frequente na população de controles que de pacientes.

Já nos casos em que o alelo ECA*D pode estar relacionado à susceptibilidade da doença, a tendência é que sua frequência mais alta ocorra na população de pacientes e seja menor na de controles, como pode ser observado nos estudos de asma realizado na Coreia (SUNG-KI-JUNG et al., 2011) e em crianças com rinite alérgica em Taiwan (LUE et al., 2006), de doenças respiratórias e injúria pulmonar aguda realizado na China (LU et al., 2011), nos estudos de câncer pulmonar realizados em Netherlands (VAN DER KNAAP et al., 2008), Croácia (PAVLIC et al., 2012), Turquia (PAVLIC et al., 2012) e China (GAO et al., 2012; DING, 2008; WANG et al., 1999), das análises de hipóxia respiratória aguda realizadas na Inglaterra (PLUNKET et al., 2008), e da Síndrome da angústia respiratória aguda realizado também na Inglaterra (MARSHAL et al., 2002). Vale observar que Ogarkov et al., (2008), também estudou a associação da ECA com a tuberculose, onde observou uma tendência no aumento da frequência do alelo ECA*D dos pacientes em relação aos controles. Quando fizeram a comparação entre as duas populações para ECA*D, não encontraram resultados significativos ($\chi^2 = 2,88$; $p = 0,0900$; $OR = 1,5$; $IC_{95\%} = 0,9 - 2,6$), nem entre as amostras de controles e hipertensos ($\chi^2 = 1,8$; $p = 0,1803$; $OR = 0,8$; $IC_{95\%} = 0,6 - 1,2$), mas obteve resultado bastante significativo quando da comparação das amostras dos pacientes com tuberculose e pacientes com hipertensão portadores do alelo ECA*D ($\chi^2 = 9,64$; $p = 0,0019$; $OR = 2,0$; $IC_{95\%} = 1,2 - 3,3$), o que sugere que o fato de pessoas serem hipertensas e adoecerem de tuberculose podem estar relacionados.

Em nosso trabalho, não pudemos fazer a análise da relação entre a tuberculose e a hipertensão, pois não foram feitas aferições de pressão arterial dos pacientes, somente foi perguntado no questionário se eles eram hipertensos ou não. Somando-se a este fato houve um número muito pequeno de pacientes que se identificaram como hipertensos, de modo que os cálculos estatísticos não seriam robustos.

Tabela 9: Frequência (%) dos alelos ECA*D e ECA*I distribuídos por região geográfica em pacientes com diversas patologias, segundo publicações científicas e do presente estudo.

FENÓTIPO/ CONTINENTE	POPULAÇÃO	N	DD	DI	II	D	I	REFERENCIAS
<u>AMERICANO DO NORTE</u>								
S.A.R.A	EUA	379	56	177	146	0,3813	0,6187	BAJWA et al., 2011
Câncer (pulmonar)	Canadá	172	46	63	63	0,4506	0,5494	VIGANO et al., 2009
Insuficiência cardíaca	Canadá	58	22	31	5	0,6466	0,3534	ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK et al., 2008
Hipert. e pressão sanguínea	EUA	139 2	445	682	265	0,5647	0,4353	O'DONNELL et al., 1998
<u>AMERICANO DO SUL</u>								
Tuberculose pulmonar	Brasil – RO	91	57	27	7	0,7747	0,2253	Presente Estudo
Hipertensão	Brasil - AM	82	8	27	47	0,2622	0,7378	FREITAS et al., 2007
Hipert. (afro-descendentes)	Brasil - BA	255	94	117	44	0,5980	0,4020	ARAÚJO, 2010
Hipertensão	Brasil - DF	48	15	22	11	0,5417	0,4583	MIRANDA-VILELA et al., 2010
Hipertensão arterial	Brasil - DF	169	39	100	30	0,5266	0,4734	MORAES, 2008
Fenótipo para problemas de P.A.	Brasil - ES	142 1	414	780	227	0,5658	0,4342	PEREIRA et al., 2003
Hipert. arterial primária	Brasil - RJ	106	35	54	16	0,5849	0,4151	FREITAS, 2006
Fibrose cística pulmonar	Brasil - SP	180	72	84	24	0,6333	0,3667	MARSON et al., 2012
<u>AFRICANO</u>								
Sarcoidose	Afro-americanos	183	56	95	32	0,5656	0,4344	MALIARIK et al., 1998
Hipertensão	Omanis	124	61	55	8	0,7137	0,2863	AL-HINAI et al., 2002
Hipertensão	Afro-americanos	468	159	238	71	0,5940	0,4060	HENDERSON et al., 2004
Angioedema	Sul-americanos	52	21	20	11	0,5962	0,4038	MOHOLISA et al., 2013
<u>EUROPEU</u>								
S.A.R.A	Alemanha	84	25	36	23	0,5119	0,4881	ADAMZIK et al., 2007
DPOC	Alemanha	152	33	76	43	0,4671	0,5329	PABST et al., 2009
DPOC	Austria	66	20	31	15	0,5379	0,4621	TKACOVÁ et al., 2005
Câncer de pulmão	Croácia	308 903	96 237	148 448	64	0,5519	0,4481	PAVLIC et al., 2012
Asma e DPOC	Dinamarca	4	4	5	2175	0,5110	0,4890	LEE et al., 2009
Predisposição para P.A.	Escócia	170	50	91	29	0,5618	0,4382	HARRAP et al., 1993
Hipert. em Caucásios	Eslovênia	413	132	199	82	0,5605	0,4395	GLAVNIK et al., 2007
	Espanha	212	42	146	24	0,5425	0,4575	VILLAR et al., 2008
S.A.R.A	Inglaterra	358	109	169	80	0,5405	0,4595	MARSHALL et al., 2002
Hipóxia aguda respiratória	Inglaterra	212	62	105	45	0,5401	0,4599	PLUNKETT et al., 2008
Câncer de pulmão	Netherlands	655	185	329	141	0,5336	0,4664	VAN DER KNAAP et al., 2008

FENÓTIPO/ CONTINENTE	POPULAÇÃO	N	DD	DI	II	D	I	REFERENCIAS
		667	186	333				
Câncer	Rotterdam	0	2	5	1473	0,5292	0,4708	KNAAP et al., 2008
Tuberculose pulmonar	Russia	200	26	116	58	0,4200	0,5800	OGARKOV et al., 2008
<u>EURO-ASIÁTICO</u>								
Hipertensão	Turquia	109	49	59	1	0,7202	0,2798	AGACHAN et al., 2003
Cancer de pulmão	Turquia	125	38	50	37	0,5040	0,4960	NACAK et al., 2010
Cancer pulmonar e anemia	Turquia	75	32	39	4	0,6867	0,3133	YAREN et al., 2007
<u>ASIÁTICO</u>								
S.A.R.A	China	140	15	65	60	0,3393	0,6607	CHAN et al., 2005
Cancer de pulmão	China	121	10	56	55	0,3140	0,6860	DING, 2008
Risco cancer de pulmão	China	684	62	271	351	0,2887	0,7113	GAO et al., 2012
Injúria pulmonar aguda	China	101	14	41	46	0,3416	0,6584	LU et al., 2011
D.R.exceto injúria pulm. Aguda	China	408	41	209	158	0,3566	0,6434	LU et al., 2011
Cancer de pulmão	China	34	18	6	10	0,6176	0,3824	WANG et al., 1999
Cancer de pulmão	China	47	5	21	21	0,3298	0,6702	ZHANG et al., 2005
Cancer de pulmão	Corea	218	30	116	72	0,4037	0,5963	CHEON et al., 2000
Asma	Corea	110	28	38	15	0,4273	0,5727	SUNG-KI-JUNG et al., 2011
Hipertensão	Japão	0	191	529	480	0,3796	0,6204	HIGAKI et al., 2000
Asma	Corea	310	43	158	109	0,3935	0,6065	LEE et al., 2000
Hipertensão	Sul da Índia	462	127	211	124	0,5032	0,4968	RAMU et al., 2011
Asma e Rinite	Taiwan	105	17	40	48	0,3524	0,6476	LUE et al., 2006
Rinite alérgica	Taiwan	106	6	48	52	0,2830	0,7170	LUE et al., 2006

(abreviações utilizadas na tabela:S.A.R.A.= Síndrome. da angustia respiratória aguda;; Hipert. = hipertensão; P.A.= pressão sanguínea; D.R.= Doenças respiratórias; pulm. pulmonar)

8.3 O Sistema eNOS4

O polimorfismo da eNOS4 foi escolhido para uma possível associação com a tuberculose devido ao fato deste gene estar relacionado a regulação homeostática da permeabilidade microvascular, participando das interações endoteliais dos neutrófilos e manutenção da perfusão local nos pulmões, sendo crucial nos mecanismos de defesa durante o início da inflamação (GAZZINELLI et al., 1992; FENG e WALKER, 1993; VALANCE & MONCADA, 1994; LEE et al., 2000) e também devido a sua ação bactericida que é conferida pela produção de óxido nítrico (KUMAR et al., 2008; HALL et al., 2009; VANIN et al., 2010). As amplificações para o sistema eNOS4 podem ser verificadas na Figura 21.

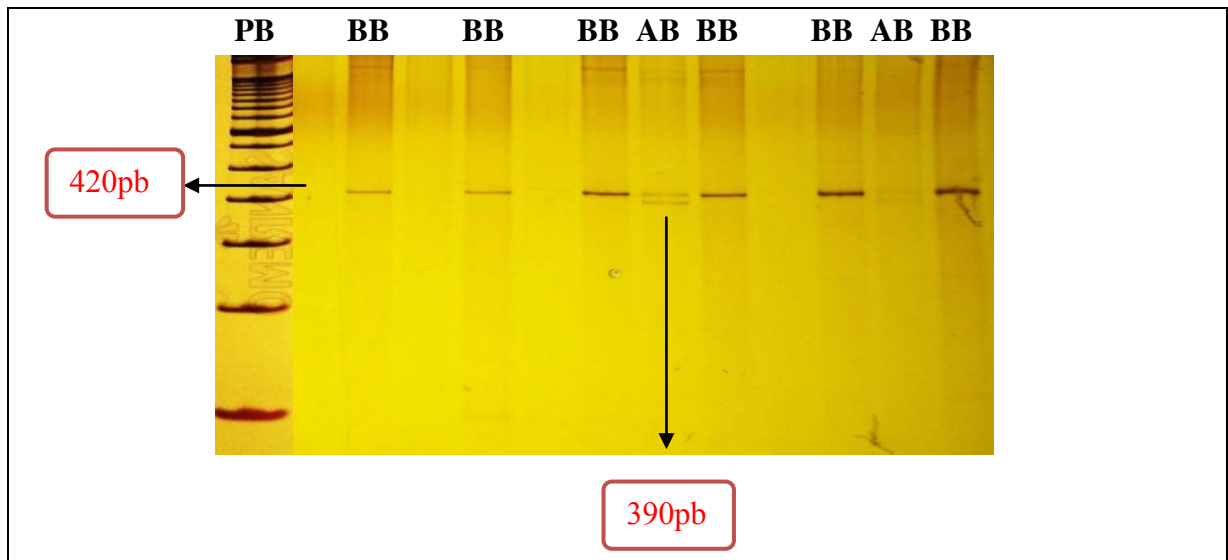


Figura 20: Gel de Poliacrilamida 8% com amplificações para os alelos do Sistema Intron 4 eNOS*A (390pb) e eNOS*B (420pb) dos pacientes com tuberculose.

As frequências encontradas para o grupo de pacientes foram de 0 (ausência) para o genótipo AA, 0,317 (20) para o genótipo AB e 0,682 (43) para BB, com IC 95% entre 0,09 – 0,22 e 0,77 – 0,90, para os alelos eNOS4*A e eNOS4*B, respectivamente. Nas amostras controle, as frequências genotípicas encontradas foram 0,378 (14) para heterozigotos AB e 0,621 (23) para homozigotos BB. Também não foram encontrados indivíduos homozigotos para o alelo A. O IC (95%) para tais controles em relação aos alelos eNOS4*A e eNOAS4*B foram, respectivamente, 0,22 – 0,53 e 0,46 – 0,77 (TABELA 10).

Tabela 10: Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo genético eNOS4 nas populações de pacientes com Tuberculose e controles saudáveis da cidade de Porto Velho – RO.

Polimorfismos eNOS4*A / eNOS4*B						
Frequências				χ^2 (p)	Frequências	
Genotípicas (Observado/Esperado)					Alélicas	
Controle	AA	AB	BB		eNOS4*A (IC 95 %)	eNOS4*B (IC95 %)
	0,000 (0 / 0)	0,378 (14 / 12,6)	0,621 (23 / 24,4)		2,014 (0,155)	0,1892 (0,22 – 0,53)
Pacientes	0,000 (0 / 0)	0,317 (20 / 21,4)	0,682 (43 / 41,6)	2,243 (0,134)	0,1587 (0,09 – 0,22)	0,8413 (0,77 – 0,90)

As frequências alélicas corresponderam, respectivamente, nos indivíduos do grupo de pacientes e controle, a 0,1587 e 0,1892 para eNOS4*A e 0,8413 e 0,8108 para eNOS4*B (TABELA 10; GRÁFICO 6).

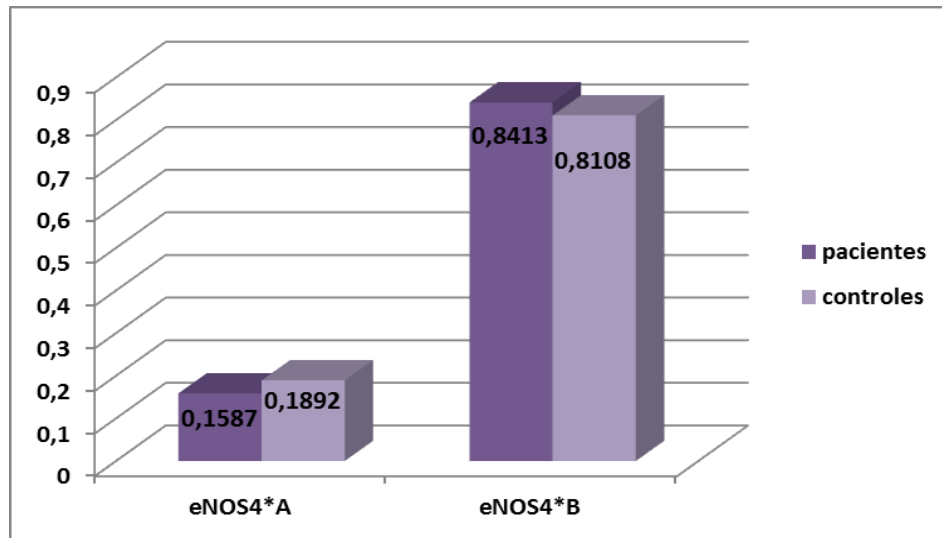


Gráfico 6: Comparação das frequências alélicas eNOS4*A e eNOS4*B encontradas em pacientes com tuberculose e controles saudáveis na população de Porto Velho – RO.

As populações de indivíduos controles e pacientes com TB, apresentadas acima, estão individualmente em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com o valor de p apresentado na tabela 11. Para comparar ambas as amostras foi necessário agrupar os genótipos AA e AB, pois como não houve nenhum achado de AA em ambas amostras, ao considerarmos esse genótipo separadamente na tabela de contingência, o valor esperado obtido é menor que 5. Desta forma, agrupando os genótipos como especificado acima, o teste de $\chi^2_{\text{contingência}} (gl=1) = 0,1618$, que equivale a um $p=0,6875$, demonstrando que não há diferenças estatisticamente significante entre as amostras populacionais de pacientes e controles (TABELA 11) para o sistema eNOS 4.

Tabela 11: Frequências alélicas do sistema eNOS4 em pacientes com teste positivo para *Micobacterium tuberculosis* e população controle, onde N é o número total de alelos amostrados por população

População	Alelo		N	χ^2	Gl	p
	eNOS4*A	eNOS4*B				
Pacientes	0,1587	0,8413	126	0,1618	1	0,6875
Controle	0,1892	0,8108	74			

Quando realizamos o cálculo do risco relativo (WOLF, 1955) para indivíduos portadores do alelo eNOS4*A desenvolverem tuberculose em relação à população controle, não encontramos nenhuma associação significativa (Risco relativo $X = 0,76$; IC (95%) $0,33 < X < 1,75$; $p=0,5240$).

A partir da análise das frequências alélicas levando em consideração o intervalo de confiança IC (95%) (GRÁFICO 7) encontrados para nossas populações de pacientes, controles e a média ponderada das populações controle brasileiras, nota-se que a maior amplitude para o IC(95%) foi encontrado na população de controles, e que o IC da população de pacientes está inserido no IC da população controle deste trabalho. Levando em consideração a comparação do IC da população brasileira com os de nosso trabalho, nota-se que este se encontra inserido nos intervalos de confiança das duas populações aqui estudadas, o que é uma indicação ainda maior de que não existem diferenças entre as nossas populações e entre elas e a população brasileira. Podemos inferir a partir destes resultados, que há uma necessidade do aumento da amostragem para este sistema a fim de diminuir a amplitude dos intervalos de confiança encontrados e assim termos uma noção mais real de como se encontra a variação da frequência alélica para este gene na cidade de Porto Velho.

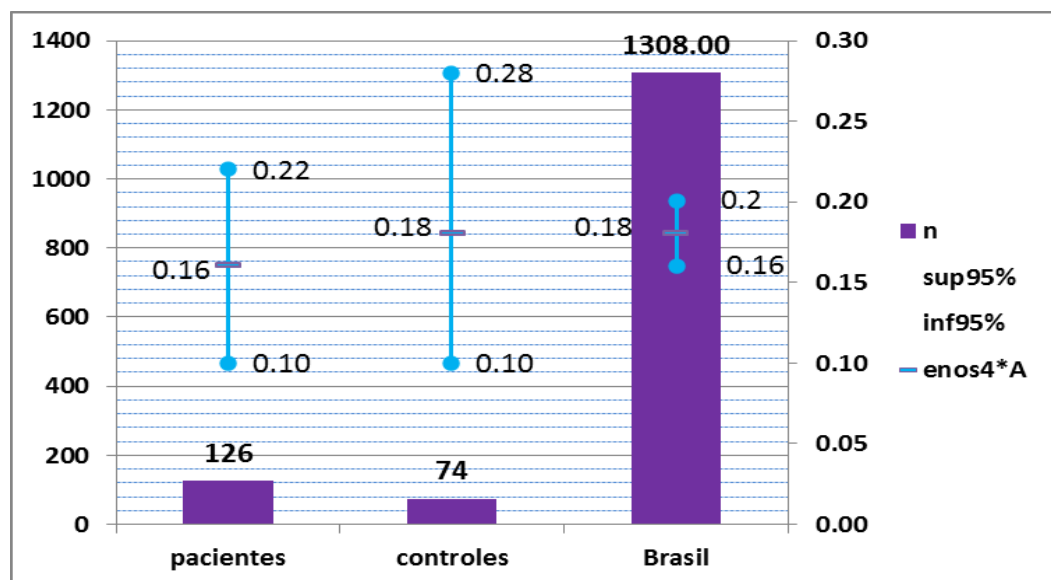


Gráfico 7: Comparação entre os intervalos de confiança (95%) dos pacientes, controles e a população brasileira para o alelo eNOS4*B. As barras em roxo representam o n amostral enquanto as linhas verticais cuja metade é assinalada por um traço, representam, respectivamente IC (95%) e o valor médio da frequência do alelo.

A tabela 12 apresenta as frequências alélicas para o sistema eNOS4 em diversas populações mundiais, comparando-as a população controle apresentada no presente estudo. Considerando as populações brasileiras que foram passíveis de agrupamento, pela análise do χ^2 heterogeneidade, foram obtidas frequências médias ponderadas para os alelos eNOS4*A e eNOS4*B de, respectivamente, 0,1835 e 0,8165. O IC (95%) observado nesta população brasileira para o alelo eNOS4*A correspondeu aos valores 0,16 – 0,20. Quando da comparação destes valores com os resultados encontrados neste trabalho, tanto para a população controle quanto para a população de pacientes, verifica-se que as duas populações tem amplitudes de IC (95%) nas quais os limites alcançados pelas frequências médias da população brasileira estão inseridos, demonstrando que nossos resultados não apresentaram diferenças com os dos estudos publicados (GRAFICO 7).

Partindo-se para a análise das frequências encontradas para o polimorfismo eNOS4 em populações controle das várias regiões geográficas (TABELA 12), percebe-se que de uma forma geral a frequência do alelo eNOS4*B se apresenta maior que a frequência de eNOS4*A em todas as populações. Na literatura estudada foram feitas algumas referências a alelos eNOS4 raros, como eNOS4*C, eNOS4*D e eNOS4*Y (DROMA et al., 2002; VARGAS et al., 2005; BOLLI et al., 2007; LUIZON et al., 2009; SERRANO et al., 2010; GAN & CHEN, 2012; SILVA et al., 2013). Porém, nenhum deles foi encontrado em nosso estudo.

Nesta análise pode-se encontrar nos grupos controles, as menores frequências encontradas, para os alelos A e B, que corresponderam a 0,0588 (DROMA et al., 2002) e 0,7389 (VARGAS et al., 2005), respectivamente. As maiores frequências encontradas para cada alelo foi eNOS4*A= 0,2500 (DOSENKO et al., 2006) e eNOS4*B= 0,9216 (DROMA et al., 2002) (TABELA 12).

Quando comparamos as frequências alélicas do presente trabalho com os da população brasileira, nota-se que as frequências aqui encontradas são muito semelhantes as encontradas nos demais trabalhos, confirmando que não há diferenças entre nossa população e as demais populações brasileiras.

Avaliando os IC (95%) da comparação entre os valores encontrados para os alelos eNOS4*A e eNOS4*B (GRÁFICO 8) pode-se notar que os ICs das populações brasileira, européia e asiática encontram-se dentro da amplitude do IC da população analisada neste trabalho evidenciando que não há diferenças entre as populações. Também pode-se perceber que a media das amplitudes para as quatro populações são muito semelhantes sendo a mais

variável aquela que teve média de 0,20 (população brasileira) corroborando com a média da amplitude de nossa população que se apresentou igual a da população asiática. Outra observação importante é que apesar da média de nossa população ser igual a da população asiática, verifica-se que a amplitude de nossas amostras é bem maior do que a da citada população, o que demonstra a relevância do tamanho amostral em relação a fidelidade das frequências de uma determinada região, uma vez que uma amplitude alta demonstra variação na frequência alélica.

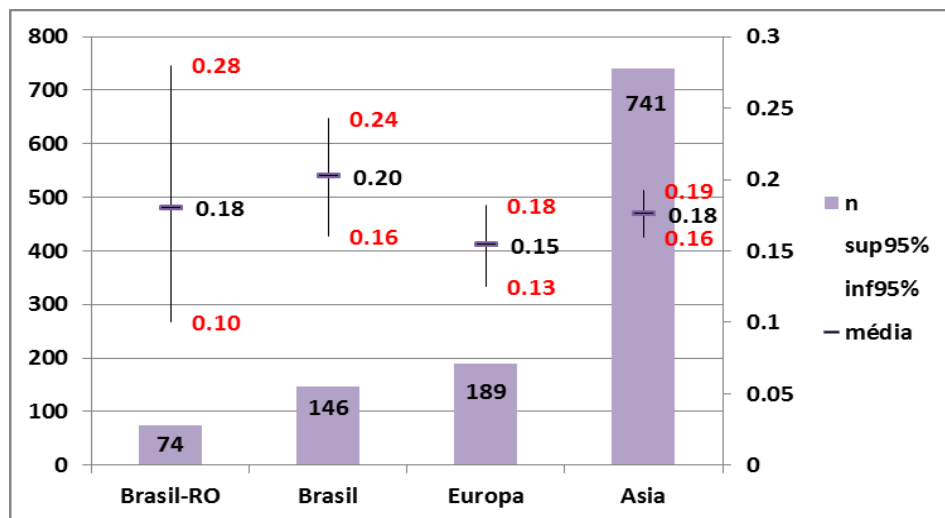


Gráfico 8: Frequências médias ponderadas do alelo eNOS4*A, com IC $\pm 95\%$, a partir de dados obtidos na literatura. As barras representam o tamanho amostral de cada amostra populacional.

Da análise dos grupos de pacientes encontrados na literatura, a maior frequência para o alelo eNOS4*A foi de 0,4484 (LEE et al., 2000) e para o alelo eNOS4*B 0,9122 (QI et al., 2006) as menores frequências para os alelos eNOS4*A e eNOS4*B foram 0,0878 (QI et al., 2006) e 0,5516 (LEE et al., 2000) respectivamente (TABELA 13).

Fazendo-se uma comparação das frequências encontradas nos grupos de pacientes (TABELA 13) das várias regiões geográficas, nota-se que a frequência do alelo eNOS4*A é levemente mais alta na região asiática, com destaque para o trabalho de LEE et al., (2000). Em se tratando das frequências das populações brasileiras, estas se apresentaram maiores do que as de nosso estudo em relação ao alelo eNOS4*A e consequentemente menores em relação ao alelo eNOS4*B.

Da comparação entre as frequências dos grupos controles (TABELA 12) e de pacientes (TABELA 13) verifica-se uma tendência no aumento da frequência do alelo

eNOS4*A no grupo de pacientes em relação ao de controles, com ênfase especial nas populações asiáticas, o que pode ser um indício de que o aumento da frequência deste alelo pode de alguma forma estar relacionado ao fenótipo de doenças, como algumas doenças relacionadas ao sistema respiratório.

Tabela 12: Frequência (%) dos alelos eNOS4*A e eNOS4*B distribuídos por região geográfica dos indivíduos controles de publicações científicas e do presente estudo.

CONTINENTE	POP.	N	AA	AB	BB	RAROS	A	B	R	REFERENCIAS
AMÉRICANO DO NORTE										
	EUA	303	12	101	190		0,2063	0,7937		KITSIONS et al., 2010
	Colombia	890	25	212	631	39	0,1472	0,8281	0,0247	SERRANO et al., 2010*
	Brasil - AM	460	22	107	329	2	0,1641	0,8315	0,0043	LUIZON et al., 2009**
	Brasil - RJ	131	3	30	95	3	0,1374	0,8397	0,0229	SILVA et al., 2013
	BRASIL – RO	37	0	14	23		0,1892	0,8108		PRESENTE ESTUDO
AMÉRICANO DO SUL										
	Brasil - RS	108	6	34	68		0,2130	0,7870		PICCOLI, 2007
	Brasil - RS	90	5	33	50	2	0,2389	0,7389	0,0222	VARGAS et al., 2005
	Brasil - RS	100	3	30	67		0,1800	0,8200		SANTOS et al., 2011
	Brasil - SP	100	4	30	66		0,1900	0,8100		SANDRIM et al., 2010
	Brasil - SP	154	6	42	106		0,1753	0,8247		METZGER et al., 2005
	Brasil - SP	142	3	39	100		0,1585	0,8415		METZGER et al., 2007
ASIÁTICO										
	China	138	1	21	116		0,0833	0,9167		DENG et al., 2007
	China	485	3	80	402		0,0887	0,9113		QI et al., 2006
	China	160	1	22	137		0,0750	0,9250		SUN et al., 2010
	Índia	133	5	23	105		0,1241	0,8759		ARIF et al., 2007
	Nordeste da Índia	812	26	203	583		0,1570	0,8430		BORAH et al. 2011
	Japão	51	1	4	45	1	0,0588	0,9216	0,0196	DROMA et al., 2002
	Japão	193	156	35	2		0,1010	0,8990		SHOJI et al., 2000
	Singapura	612	10	117	460	25	0,1119	0,8472	0,0408	GAN and CHEN, 2012
	Sul da Coreia	121	1	29	91		0,1281	0,8719		LEE et al., 2000
EUROPEU										
	Espanha	400	7	97	296		0,1388	0,8613		ALVAREZ et al., 1999
	Itália	500	18	135	345	2	0,1710	0,8250	0,0040	BOLLI et al., 2007
	Republica Checa	209	4	60	145		0,1627	0,8373		HOLLA et al., 2002
	Republica Checa	316	11	93	212		0,1820	0,8180		HOLLA et al., 2008
	Rússia	627	9	172	446		0,1515	0,8485		KORSHUNOVA et al., 2004
	Ucrania	30	3	9	18		0,2500	0,7500		DOSENKO et al., 2006
EURO-ASIÁTICO										
	Turquia	181	2	36	143		0,1105	0,8895		BAYAZIT et al., 2009
	Turquia	43	0	16	27		0,1860	0,8140		SEN et al., 2008

Tabela 13: Frequência (%) dos alelos eNOS4*A e eNOS4*B distribuídos por região geográfica dos pacientes de publicações científicas e do presente estudo.

FENÓTIPO/ CONTINENTE	POPULAÇÃO	N	AA	AB	BB	RAROS	A	B	R	REFERENCIAS
<u>AMERICANO</u>										
<u>DO SUL</u>										
Tuberculose										PRESENTE
pulmonar	BRASIL-RO	63	0	20	43		0,1587	0,8413		ESTUDO
Anemia falciforme	Brasil - RS	73	5	30	38		0,2740	0,7260		VARGAS et al., 2005
Baixa aptidão cardiorespiratória	Brasil - SP	92	10	24	58		0,2391	0,7609		MALAGRINO et al., 2013
Síndrome coronária aguda	Brasil - RS	135	14	31	87		0,2185	0,7815		PICCOLI, 2007
<u>EUROPEU</u>										
Síndrome coronária aguda	Itália	489	13	135	332	9	0,1646	0,8170	0,0184	BOLLI et al., 2007
Asma	Republica Checa	163	5	44	113	1	0,1656	0,8282	0,0061	HOLLA et al., 2002
Asma	Republica Checa	294	12	89	193		0,1922	0,8078		HOLLA et al., 2008
Hipertensão em adolescentes	Ucrânia	30	3	9	18		0,2500	0,7500		DOSENKO et al., 2006
Hipertensão pulmonar e DPOC	Zulrich-Suíça	98	2	34	62		0,1939	0,8061		ULRICH et al., 2010
<u>EURO-ASIÁTICO</u>										
Apnéia do sono	Turquia	48	1	13	33	1	0,1563	0,8229	0,0208	BAYAZIT et al., 2009
<u>ASIÁTICO</u>										
Hipertensão	China	151	4	24	123		0,1060	0,8940		DENG et al., 2007
Hipertensão	China	501	3	82	416		0,0878	0,9122		QI et al., 2006
Edema pulmonar de altitude	China	149	2	28	119		0,1074	0,8926		SUN et al., 2010
DPOC	Índia	190	13	57	120		0,2184	0,7816		ARIF et al., 2007
Edema pulmonar de altitude	Japão	41	2	15	24		0,2317	0,7683		DROMA et al., 2002
Cancer de pulmão	Japão	108	1	20	87		0,1019	0,8981		FUJITA et al, 2010
Hipertensão	Japão	183	1	39	143		0,1120	0,8880		SHOJI et al., 2000
Asma	Sul da Coreia	310	3	272	35		0,4484	0,5516		LEE et al, 2000

9.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acredita-se que a susceptibilidade a tuberculose é, na realidade, uma manifestação de característica multifatorial, onde além dos fatores genéticos, outros como diabetes, fumo, drogas e hipertensão, além do HIV, possam também influenciar tanto na susceptibilidade quanto a progressão da infecção.

Este trabalho é o primeiro que tenta associar a tuberculose com os polimorfismos genéticos da ECA e da eNOS, baseando-se no papel fisiológico que tais enzimas executam no metabolismo do organismo. Experimentalmente nenhuma relação foi encontrada para o polimorfismo do íntron 4 da eNOS. E, embora o número de indivíduos analisados seja considerado baixo, a análise comparativa das frequências alélicas do sistema eNOS4 não estimula ao aumento da amostra, uma vez que todas as populações descritas na literatura apresentaram valores semelhantes entre si. Entretanto, pelo papel biológico desta enzima, sugere-se para trabalhos futuros, que outros polimorfismos encontrados nos genes NOS3 (eNOS-7) e NOS 2 (iNOS) sejam utilizados em associação com ECA e tuberculose.

No que concerne ao polimorfismo da ECA, nossos resultados indicam que a presença do alelo ECA*D possa contribuir na proteção contra a tuberculose. Todavia, faz-se necessário maior esforço amostral para que se confirmar a significância estatística encontrada no presente estudo.

Somando-se aos dados apresentados, o presente trabalho ainda possui relevância, pela sua iniciativa em relacionar os polimorfismos de genes atuantes no stress oxidativo com a tuberculose, uma doença considerada como importante problema de saúde pública mundial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L.; and CASANOVA, J. L. Genetic Predisposition to Clinical Tuberculosis: Bridging the Gap between Simple and Complex Inheritance. **Am. J. Hum. Genet.** 67: 274–277, 274, 2000.

ABRAHÃO, R.M.C.M. **Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: considerações gerais e a importância dos reservatórios animais.** 1998. 318 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Faculdade de Saúde pública – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ACKERMANN, A.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S.; ROJAS, R. S. et al. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, v.124, n.2, p: 291–298, May, 1998.

ADAMZIK, M.; FREY, U.; SIXT, S.; et al. ACE I/D but not AGT (-6) A/G polymorphism is a risk factor for mortality in ARDS. **European Respiratory Journal**, 29: 482–488, 2007.

AGACHAN B, ISBIR T, YILMAZ H, AKOGLU E. Angiotensin converting enzyme I/D, angiotensinogen T174M-M235T and angiotensina II type 1 receptor A1166C gene polymorphism in Turkish hypertensive patients. **Exp Mol Med.**, v. 35, n. 6, p: 545-549, 2003.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357, p: 593-615, 2001.

AL-HINAI, A. T.; HASSAN, M. O.; SIMSEK, M. et al. Genotypes and allele frequencies of angiotensin converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism among Omanis. **Squ Journal for Scientific research: Medical Sciences**. Vol. 4, N. 1–2, 25–27, 2002.

ALJANABI, S.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res.**; **25**: 4692–4693, 1997.

ALMADA, B. V. P.; BRAUN, V.; NASSUR, B. A., et al. Associação da hipertensão arterial com polimorfismo da enzima conversora da angiotensina em indivíduos idosos. **Rev. Bras Clin Med.**, 8(4):320-2, 2010.

ALOELIVE em prol da saúde preventiva. **Tuberculose e seus sintomas retornam com força total.** 2011. Disponível em: <<http://www.aloelive.com.br/Blog/tuberculose-e-seus-sintomas-retornam-com-forca-total/#more-3124>>. Acesso em: 10 março, 13:14:20, 2012.

ALVAREZ, R.; ALVAREZ, V.; LAHOZ, C. H. et al. Angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase DNA polymorphisms and late onset Alzheimer's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 67 p: 733–736, 1999.

ALVES, M. F.; ARAUJO, M. C.; JULIANO, M. A.; et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. **38**, pp. 861-868, 2005.

AMERICAN THORACIC SOCIETY DOCUMENTS, **Amj. Respir. Crit. Care Med.** Vol. 168, Pg. 823-855, 2006.

AMIRZARGAR, A.A.; YALDA, A.; HAJABOLBAGHI, M.; et al. The association of HLA-DRB, DQA1, DQB1 alleles and haplotype frequency in Iranian patients with pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, v.8 n.8, pp.1017-1021, ISSN, 1027-3719, 2004.

ANDERSSON, R. G. G., AND PERSSON, K. ACE- inhibitors and their influence on inflammation, bronchial reactivity and cough. *Europ Heart J*. 15, 1994, Suppl. C, 52-56, 1994.

ANDRADE, R.G.D.; **Estudo clínico, angiográfico, de procedimento e polimorfismos. Eventos maiores e reestenose após intervenção coronariana percutânea.** Dissertação de Mestrado da Disciplina de Cardiologia da Faculdade de Medicina do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense. 2009.

ANTIGUIDADE COLEÇÕES E ARTES. **Combate a tuberculose** – Filatelia. Waldemar Neto. Disponível em: <<http://antiguidadecolecoeseartes.blogspot.com.br/2008/08/combate-tuberculose-filatelia.html>>. Acesso em: 12 janeiro, 15:25:35, 2012.

ARAI, L. R. *Mycobacterium bovis e Mycobacterium tuberculosis*. Slide UFF – NITERÓI, 22/09/2008. Disponível em: <http://www.uff.br/labac/Mycobacterium_Tb_e_Bovis.pdf>. Acesso em: 15/10/2011. 22:13:43, 2008.

ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; MAMPASO, E. G. et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. caprae, subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol*, v.3, p: 1263-73, 1999.

ARAÚJO, L. J. **Estudo sobre aspectos genéticos da hipertensão arterial sistêmica em afro descendentes do sudoeste do estado da Bahia.** 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

ARCHERS, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.*, 7: 349-60, 1993.

ARIF, E.; AHSAN, A.; VIBHUTI, A.; et al. Endothelial nitric oxide synthase gene variants contribute to oxidative stress in COPD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 182–188, 2007.

ARMSTRONG, J. A. and HART, P. D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on the fusion of lysosomes with phagosomes. *J. Exp. Med.* **134**, 713-740, 1971.

AVAD, P.R. **Raising polyclonal antibodies against Mycobacterium toxoid in laboratory animals.** 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em farmácia e biotecnologia farmacêutica) – Rajiv Gandhi University of Health Sciences – Department of Pharmaceutical Biotechnology, Bharathi Nagara, 2010.

AZAD, A. K., SADEE, W., SCHLESINGER, L. S. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun.* 80 (10) : 3343-59, 2012.

BAARSMA GS, LA HEY E, GLASIUS E, DE VRIES J, KIJLSTRA. A The predictive value of serum angiotensin converting enzyme and lysozyme levels in the diagnosis of ocular sarcoidosis. *Am J Ophthalmol*, 104:211-7, 1987.

BAJWA, E. K.; CREMER, P. C.; GONG, N. M.; et al. An NFkB1 Promoter insertion/Deletion Polymorphism Influences Risk and Outcome in Acute Respiratory Distress Syndrome among Caucasians. Volume 6, **Issue 5**, e19469, 2011.

BALAMURUGAN, A.; SHARMA, SK.; MEHRA, NK. Human leukocyte antigen class I supertypes influence susceptibility and severity of tuberculosis. **J Infect Dis**, v.189, n.5, pp.805-811, ISSN, 0022-1899, 2004.

BALASUBRAMANIAN, V.; PAVELKA, M. S. J.R.; BARDAROV, S.S.; MARTIN, J.; WEISBROD, T.R.; MCADAM, R.A. et al. Allelic exchange in Mycobacterium tuberculosis with long linear recombination substrates. **J Bacteriol**, 178:273-9, 1996.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr., Campinas**, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.

BARNES, P.F.; CAVE, M.D. Molecular epidemiology of tuberculosis. **N Engl J Med**. 349:1149-56, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, 29, 113, 2006.

BARRETO, M.L; PEREIRA, S.M; FERREIRA, A.A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. **Jornal de Pediatria - Vol. 82, Nº3(Supl)**, 2006.

BARRIOS, V.; TOMAS, J. P.; RUILOPE, L. M. Avances en el tratamiento de la hipertensión arterial con antagonistas de los receptores de la angiotensina. **Rev Costarric Cardiol.**, v.4, n.3 Dic.2002.

BARROSO, M. M. H. S. V. **Caracterização dos efeitos provocados pela acumulação de s-adenosil-homocisteína na expressão dos genes envolvidos na biodisponibilidade de óxido nítrico**. 2009. 30 p. Dissertação. (Mestrado em Biologia Molecular Humana) – Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2009.

BASTA, P. C. **As pestes do século XX: tuberculose e aids no Brasil, uma história comparada**. Nascimento DR. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2005. 196 pp. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22(2):456-462, fev, 2006.

BAUDIN, B. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. **Clin Chem Lab Med**, 38, 853-6, 2000.

BAYAZIT, .Y. A.; YILMAZ, M.; ERDAL, E. et al. Role of nitric oxide synthase gene intron 4 and exon 7 polymorphisms in obstructive sleep apnea syndrome. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 266:449–454, 2009.

BECARI, C.; OLIVEIRA, E. B.; SALGADO, M. C. O. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Braz J Med Biol Res**, Vol. 44 (9) 914-919, 2011.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, 271: C1424-37, 1996.

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L.; **Ecology from individuals to ecosystems**. 4ª edição, Graphicraft Limited, Hong Kong, 2006.

BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M. e REMOLD, H.G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nat Rev Microbiol**. 8(9): 668–674. doi:10.1038/nrmicro2387, 2010.

BEIGUELMAN, Bernardo. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

BELDENT, V.; MICHAUD, A.; WEI, L. et al. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. **J Biol Chem**, 268: 26428-26434, 1993.

BELISLE, J.T.; VISSA, V.D.; SLEVERT, T.; TAKAYAMA, K.; BRENNAN, P. J.; BESRA, G.S. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. **Science**, 276:1420-2, 1997.

BELLAMY, R. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations. **Thorax**, 53, p. 588–593, 1998.

BELLAMY, R.; BEYERS, N.; MCADAM, K. P. W. J.; et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: A genome-wide scan. **PNAS**, v. 97, n.14, p. 8005–8009, 2000.

BELLINI, M. H.; FIGUEIRA, M. N.; PICCOLI, M. F.; MARUMO, J. T.; CENDOROGLO, M.S., et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism with end-stage renal disease. **NEPHROLOGY**, 12, 289–293, 2007.

BELTRAME, M. H. **Estudo de populações de diferentes ancestralidades e evolução de polimorfismos dos genes CD80 E CD86**. 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BENESSIANO J, CRESTANI B, MESTARI F, et al. High frequency of a deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene in asthma. **J Allergy Clin Immunol**. 99:53–57, 1997.

BERRINGTON, W. R.; HAWN, T. R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? **Immunol Rev**. October ; 219: 167–186, 2007.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**. 12,(12), p.123-30, 1999.

BLACKWELL, J.; BARTON, C.; WHITE, J.; et al. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. **Mol Med**, 1: 194–205, 2004.

BOEHM, M.; & NABEL, E. G. Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulator. **New Eng. J. Med**. 347: 1795-1797, 2002.

BOLIN, A. P. **Efeito do Tratamento com Metilglioxal e Glicose na Função de Linfócitos Humanos – Possível Papel Protetor da Astaxantina e da Vitamina C**. 2012. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, 2012.

BOLLI, P.; STICCHI, E.; ABBATE, R.; FATINI, C.; A novel allele of eNOS gene in the Italian population: The actual essence of intron 4 polymorphism. **Nitric Oxide**, 16, 392–394, 2007.

BONFIM-SILVA, R.; RIOS, D. L. S.; Polimorfismos genéticos do sistema renina-angiotensina-aldosterona na doença arterial coronariana e na hipertensão arterial sistêmica. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 28-40, 2012.

BORAH, P. K.; SHANKARISHAN, P.; AHMED, G. Polymorphism of angiotensin converting enzyme (insertion/deletion) and endothelial nitric oxide synthase (intron 4ab) genes in a population from northeast India. **Journal of Genetics** Vol. 90, Online Resources. **J. Genet**. 90, e105–e109. 2011.

BOWLER, R. P. & CRAPO, J. D. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. **J. Allergy Clin Immunol**, 110:349-56, 2002.

BRAHMAJOTHI, V.; PITCHAPPAN, R.M.; KAKKANAIHAH, V.N.; SASHIDHAR, M. et al. Association of pulmonary tuberculosis and HLA in south India. **Tubercle**, v.72, n.2, pp. 123-132, ISSN, 0041-3879, 1991.

BREDT, D.S. & SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc. Natl .Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 9030-3, 1989.

BRENNAN, P.J.; & NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p: 29-63, 1995.

BRITO, A. C. **Estudo fenotípico e molecular de micobactérias de crescimento rápido de interesse em saúde pública**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde pública) – Faculdade de Saúde pública – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BURTON, P.R.; TOBIN, M.D.; HOPPER, J.L. Key concepts in genetic epidemiology. **Lancet** 366(9489):941-51, 2005.

CABELLO., P. H.;KRIEGER., H. 1997. **Genioc: Sistema para análises de dados de genética**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

CAMACHO, L.R.; ENSERGUEIX, D.; PEREZ, E.; GICQUEL, B.; GUILHOT, C. Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis. **Mol Microbiol**;34:257-67, 1999.

CAMBIEN, F.; ALHENC-GELAS, F.; HERBETH, B.; ANDRE, J.L.; RAKOTOVAO, R.; GONZALES, M. F.; ALLEGRIINI, J.; BLOCH, C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. **Am J Hum Genet**, 43:774–780, 1988.

CAMBIEN, FRANÇOIS; POIRIER, ODETTE; LECERF, LAURE. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature**, v. 359, p: 641 – 644, 1992.

CAMÓS, S.; CRUZ, M. J.; MORELL, F. et al. Genetic-based reference values for angiotensin-converting enzyme (ACE) according to I/D polymorphism in a Spanish population sample. **Issue**, volume 50, 10, pages 1749–1753, ISSN (Online) 1437-4331, ISSN (Print) 1434-6621, 2012.

CAMPELL, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. **The Journal of Clinical Investigation**, 79:1-6, 1987.

CAMPOS R; PIANTA C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. **Bol. da Saúde**, v. 15, n. 1, 2001.

CAMPOS, H.S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ** 2006; 15 (1): 29-35.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H. M. Newly Recognized Components of the Renin- Angiotensin System: Potential Roles in Cardiovascular and Renal Regulation. **Endocr. Rev.** 24: 261, 2003.

CASTRO, C. B. A.; COSTA, P. A.; RUFFINO-NETO, A. et al. Avaliação de um escore clínico para rastreamento de suspeitos de tuberculose pulmonar. **Rev Saúde Pública**, 45(6):1110-6, 2011.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. & OHARA A.. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, vol. 30, no. 2, p. 441-449, 2007.

CESAR, L. A. M. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e doenças isquêmicas. **Rev Bras Hipertens.**, v.7, n.3, p: 255-60, julho/setembro, 2000.

CHACÓN, O.; REALPE, T.; BARLETTA, R. G. Inactivación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis. **Biomédica**, 24 (Supl.): 165-87, 2004.

CHAKRAVARTI, A.; GUNTER, C.; FLINTOFT, L. Genetics and Genomics of Infectious Diseases. **The American society of human genetics**, 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/natureconferences/ggid2009/report.html>. Acesso em: 15 de novembro de 2012.

CHAN, Y. et al. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. **J. Biol. Chem.** 279, 35087-35100, 2004.

CHAN, K. C. A.; TANG, N. L. S.; HUI, D. S. C.; et al. Absence of association between angiotensin converting enzyme polymorphism and development of adult respiratory distress syndrome in patients with severe acute respiratory syndrome: a case control study. **BMC Infectious Diseases**, 5:26, 2005.

CHANG, S. T.; LINDERMAN, J. J. and KIRSCHNER, D. E. Effect of Multiple Genetic Polymorphisms on Antigen Presentation and Susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Infection and Immunity**, p. 3221–3232, v. 76, n. 7, 2008.

CHEON, K. T.; CHOI, K. H.; LEE, H. B. et al. Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with lung câncer. **Lung**, 178, 351-360, 2000.

CHIARANI, F. **Estudos bioquímicos em modelo experimental de deficiência de sulfito oxidase**. 2008. 61 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

COELHO, A. G. V.; ZAMARIOLI, L. A.; REIS, C. M. P. V e DUCA, B. F. L. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bras Pneumol**. 33 (6):707-711, 2007.

COELHO, C. et al. Genetic polymorphisms of angiotensin-I converting enzyme, haptoglobin and angiotensinogen and oxidative stress parameters in 12 to 15-year-old adolescents. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, S 1, v. 25, n. 7-8, p. 677-690, 2006.

COELHO, F. S. & MARQUES, E. A. Etiologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ.v.5, n.2, 2006.

COELHO, M. R. T. **Impacto do reconhecimento de micobactérias por toll like receptors na regulação da IL-10 e nas respostas do tipo T helper**. 2012. 162 f. Tese. (Doutorado em Ciências da Saúde), Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho, Braga, 2012.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, 393:537-44, 1998.

COLLINS, M.; XENOPHONTOS, S.L.; CARIOLOU, M.A.; MOKONE, G.G.; HUDSON, D.E.; ANASTASIADES, L. & NOAKES, T.D. The ACE gene and endurance performance during the South African Ironman Triathlons. *Med Sci Sports Exerc*, 36, 1314–1320, 2004.

COMSTOCK G. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the Proffit Study. *Am Rev Resp Dis* 117: 621–624, 1978.

CONNELL, T. G.; DAVIES, M. A.; JOHANNISEN, C.; et al. Reversion and conversion of *Mycobacterium tuberculosis* IFN- γ ELISpot results during anti-tuberculous treatment in HIV-infected children. *BMC Infectious Diseases*, 10:138, 2010.

CONTRA, H.S.; ESTRADA, L.R.; CHÁVEZ, A. G.; HERNÁNDEZ, H. H. El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Revista Mexicana de Cardiología*, v.19, n.1, p: 21 – 29, Enero – Marzo, 2008.

CORRAL, H.; PARI'S, S. C.; MARI'N, N. D. et al. IFN γ Response to *Mycobacterium tuberculosis*, Risk of Infection and Disease in Household Contacts of Tuberculosis Patients in Colombia. *PLoS ONE* 4(12): e8257, 2009.

CORREIA, C. Epidemiologia genética. *Revista Factores de Risco*, nº 8, jan-mar, p. 60-65, 2008.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, v. 53, p: 1305-1314, 2003.

COX, J.S.; CHEN, B.; MCNELL, M.; JACOBS, W.R Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*, 402:79-83, 1999.

CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417: 822-828, 2002.

CRIASAUDE.COM.BR. Estatísticas Tuberculose. Disponível em: <<http://www.criasaude.com.br/N2810/doencas/tuberculose/estatisticas-tuberculose.html>>. Acesso em: 03/08/2012. 16:44, 2012.

CUNHA, G. M. M. **Alterações nas concentrações das SRAT, conteúdo de GSH e atividade da CAT em pacientes com esquistossomose aguda.** 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

DANNENBERG, A. M., Jr. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* 191:461–473, 1994.

DE PAULA, W. X.; SINISTERRA, R. D.; SANTOS, R. A. S.; BERALDO, H. A química inorgânica no planejamento de fármacos usados no controle da hipertensão. *Cadernos temáticos de química nova na escola*, Nº 6 – JULHO 2005

DENG, F.; HU, Q.; TANG, B.; HE, F.; et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Intron 4, 27 bp Repeat Polymorphism and Essential Hypertension in the Kazakh Chinese Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(5): 311–316, 2007.

DIAS, F. S.; ALHO, C. S.; HENKIN, C. S.; COELHO, J. C. et al. Suscetibilidade genética na lesão pulmonar aguda e síndrome da angústia respiratória aguda. **Rev Bras Ter Intensiva**, 21(4):416-424, 2009.

DIAS, F. S.; **Polimorfismo I/D do gene ECA em pacientes com Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA)**. 2007. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DIAS, R. G. Genética, Performance Física Humana e Doping Genético: o Senso Comum Versus a Realidade Científica. **Rev Bras Med Esporte** – Vol. 17, No 1, p. 62-70, Jan/Fev, 2011.

DIKMEN, M. et al. Are the angiotensin-converting enzyme gene and activity risk factors for stroke? **Arquivo de Neuro-psiquiatria**, [S.l.], v. 64, n. 2, p. 211-216, 2006.

DIMANTAS, M. A. P.; LOWDER, C.; MUCCIOLI, C. Uveítes anteriores associadas a doenças sistêmicas. **Arq Bras Oftalmol**, 66:235-8, 2003.

DING, X.J. Analysis of the relationship between the polymorphism of angiotensin- converting enzyme gene and lung cancer (Chinese). 2008.

DOSENKO, V. E.; ZAGORIY, V. Y.; LUTAY, Y. M.; PARKHOMENKO, A. N.; MOIBENKO, A. A. Allelic polymorphism in the promoter (T-786→C), but not in exon 7 (G894→T) or the variable number tandem repeat in intron 4, of the endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with acute coronary syndrome in the Ukrainian population. **Exp Clin Cardiol**. Vol. 11, n.1, p. 11-13, 2006.

DOSENKO, V.E., et al. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. **Acta Biochimica Polonica**. vol. 53, n. 2/2006, 299-302, 2006.

DRAIN, P. K.; KUPKA, R.; MAGUSI, F. et al. Micronutrients in HIV-positive persons receiving highly active antiretroviral therapy. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n. 2, p. 333-345, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev.**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DROMA, Y.; HANAOKA, M.; OTA, M. et al. Positive Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms With High-Altitude Pulmonary Edema. **Circulation**, v. 106, p: 826-830, 2002.

DUARTE, R.; CARVALHO, C.; PEREIRA, C.; BETTENCOURT, A.;et al. HLA class II alleles as markers of tuberculosis susceptibility and resistance. **Rev Port Pneumol**, Vol.17, n.1, pp. 15-19, ISSN 0873-2159, 2011.

DUBANIEWICZ, A.; LEWKO, B.; MOSZKOWSKA, G.; ZAMORSKA, B.; STEPINSKI, J. Molecular subtypes of the HLA-DR antigens in pulmonary tuberculosis. **Int J Infect Dis**, v.4, n.3, pp.129-133, ISSN, 1201-9712, 2000.

DUBOS, R. & DUBOS, J. The white plague: tuberculosis, man and society. Boston: Little, Brown, 1952.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre o óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol. 39, n.4, p: 343-350, Mai/jun 2003.

DYE, C.; SCHEELE, S.; DOLIN, P.; PATHANIA, V.; RAVIGLIONE, M. C. Global Burden of Tuberculosis: Estimated Incidence, Prevalence and Mortality by Country. **Journal of the American Medical Association**. 282:677–86, 1999.

DZAU, V.J. Circulating versus local renin angiotensin system I cardiovascular homeostasis. **Circulation**, 77: 4-13, 1988.

ELENI, S.; DIMITRIOS, K.; VAYA, P; et al. Angiotensin-I converting enzyme gene and I/D polymorphism distribution in the Greek population and a comparison with other European populations. **Journal of Genetics**, Vol. 87, No. 1, April 2008.

EL-SHAFAI, M.S.; FARRES, M. N.; SHANIN, R.Y. Evaluation of angiotensin converting enzyme gene polymorphism and susceptibility to bronchial asthma among Egyptians. **Allergologia et immunopathologia**, v.315, p:1-6, 2011.

ELSHAMAA, M. F.; SABRY, S. M.; BAZARAA, H. M.; et al. Genetic polymorphism of ACE and the angiotensin II type1 receptor genes in children with chronic kidney disease. **Journal of Inflammation**, 8:20, 2011.

ERDOS, E. G., AND SKIDGEL, R. A. The angiotensin I-converting enzyme. **Lab. Znuet.** 56, 365-368, 1987.

EUZÉBY, J. P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. 2005. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>>. Acesso em 19 fev 2012. 21:54:23.

FAGAN, K.A.; MORRISSEY, B.; FOUTY, B. W. et al. Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Respir Res.**, v. 2, p:306–313, 2001.

FALKOW, S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. **Nature Reviews, Microbiology**, v.2, n. 67, 2004.

FEITOSA, M. F.; KRIEGER, H. O futuro da epidemiologia genética de características complexas. **Ciencia e saúde coletiva**, 7 (1) : 73-83, 2002.

FEITOSA, M. F.; KRIEGER, H.; BEIGUELMAN, B. Epidemiologia genética da hanseníase e da reação de Mitsuda. **Hansen. Int.**, 20(2):5-8, 1995.

FENG, H.M.; WALKER, D.H.; Interpheron-gamma and tumor necrosis factor alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide. **American J Physio**, 143: 1016-1023, 1993.

FERREIRA, A. L. A.; & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**, 43(1):61-8, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.; Review article Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408, 239-247, 2000.

FIGOIRESE, M. H.H. **Prevalência do Sistema eNOS na População do Município de Porto Velho (RO)**. 47 f. Monografia. (Bacharelado em Ciências Biológicas) Departamento de Biologia, Universidade Federal de Rondonia –UNIR, 2010.

FLANNAGAN, R.S., COSIO, G., AND GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature reviews Microbiology** 7, 355-366, 2009.

FLESCHE, I. E. A. and KAUFMANN, S. H. E. Role of cytokines in tuberculosis. **Immunobiology** 189, 316-339, 1990.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**; 46(3): 265-71, 2000.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. O óxido nítrico como neurotransmissor no sistema nervoso entérico: fisiopatologia e implicações no íleo adinâmico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias** – vol. XXV – n. 5- 343-348, 1998.

FORSTERMANN, U.; BOISSEL, J.P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III) **Faseb J.** 2:773–790, 1998.

FRANCO, E. et al. Renin-angiotensina-aldosterone system polimorfismos: a role or a hole in occurrence and long-term prognosis of acute myocardial infarction at young age. **BMC Medical Genetics**, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 18-27, 2007.

FRANKEN, R. A. et al. Associação do polimorfismo do gene da enzima conversora da angiotensina com dados ecocardiográficos em jovens normotensos filhos de hipertensos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S.l.], v. 50, n. 1, p. 62-67, 2004.

FRESHOUR, J.R.; CHASE, S.E.; VIKSTROM, K. L. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2002; 283:1997-2003.

FREITAS, S. R. S. **Epidemiologia genética da Hipertensão Arterial primária em populações brasileiras: estudo de polimorfismos em genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona de fatores clínicos/antropométricos.** 2006. Tese (Doutorado em Biologia celular e molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2006.

FREITAS, S.R.S.; CABELLO, P.H.; MOURA-NETO, R.S.; DOLINSKY, L.C.; BÓIA, M.N. Análise combinada de fatores genéticos e ambientais na hipertensão essencial em município da Região Amazônica. **Arq Bras Cardiol.**, v. 88, n. 4, p: 447-51, 2007.

FRESHOUR, J. R.; CHASE, S. E.; VIKSTROM, K. L. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice, **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2002; 283:1997-2003, 2002.

FUJITA, S.; MASAGO, K.; HATACHI, Y.; ET AL. Genetic Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene correlate with overall survival in advanced non-small –cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. **BMC Medical Genetics**, 11:167, 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. 2002. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração Ensino-Serviço. 5. ed. – Rio de Janeiro: FUNASA/CRPHF/SBPT, 2002.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. 2008. **Controle da Tuberculose: Uma Proposta de Integração Ensino-Serviço.** 22 ed. 348 f, 2008.

FUNDO global. Tuberculose: História. Fundo Global tuberculose Brasil. Disponível em: <<http://www.fundoglobaltb.org.br/site/tuberculose/historia.php?Section=3&SubSection=2>>. Acesso em: 13 jan.2012. 2:00:08.

FURCHGOTT, R. F. The Role of Endothelium in the Responses of Vascular Smooth Muscle to Drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, V. 24: 175-197, 1984.

FURCHGOTT, R.T. & ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 373-6, 1980.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **Journal of Internal Medicine**, 264: 224–236, 2008.

GALLAGHER, P. E.; LI, P.; LENHART, J.R.; CHAPPELL, M.C.; BROSNIHAN, K.B. Estrogen Regulation of Angiotensin-Converting Enzyme mRNA. **Hypertension** 1999; 33[part II]:323-328, 1999.

GALVAO, A.; SKARZYNSKI, D. J.; SZOSTEK, D. J.; et al. Cytokines tumor necrosis factor- α and interferon- γ participate in modulation of the equine corpus luteum as autocrine and paracrine factors. **Journal of Reproductive Immunology**, n.93, p. 28 – 37, 2012.

GAN, Y.Y. & CHEN, C. F. The 27-bp VNTR Polymorphism in Intron 4 of the Human eNOS Gene in Healthy Singaporean Chinese, Indians, and Malays. **Biochem Genet**, 50:52–62, 2012.

GAO, M.; WANG, Y.; SHI, Y.; et al. The relationship between three well-characterized polymorphisms of the angiotensin converting enzyme gene and lung cancer risk: a case-control study and a meta-analysis. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System** 2012 13: 455, 2012.

GAVRAS, I.; GAVRAS, H. The reninangiotensin system in hypertensive cardiac disease. In: Ulfendahl HR, Aurell M (eds.), **Renin-Angiotensin**. A Centenary Symposium of the discovery of the renin-angiotensin system. Portland Press Ltd., London, pp. 265-72, 1998.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **European J Immuno**, 22: 2501-2506, 1992.

GIESTAS, A. PALMA, I. RAMOS, M. H. Sistema Renina-Angiotensina- Aldosterona e sua modulação farmacológica. **Acta Med. Port.**, v. 23, n. 4, p: 677-688, 2010.

GLAVNIK, N.; PETROVIC, D. M235T polymorphism of the angiotensinogen gene and insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-1 converting enzyme gene in essential arterial hypertension in Caucasians. **Folia Biologica (Praha)**, v.53, p.69- 70, 2007.

GÓES FILHO, L. S.: **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência**. 2005. 84 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – Programa de Pós-Graduação em Física, Centro Técnico Científico da PUC-Rio, Rio de Janeiro, 2005.

GOMES, K. R. M. **Padrão de expressão gênica e localização tecidual no rato de um novo membro do Cluster gênico da enzima conversora da angiotensina I: variante-4**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOMES, M. J. P. **Gênero *Mycobacterium* spp**. Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225. ÁREA DE BACTERIOLOGIA, UFRGS, 2011. Disponível em: < <http://www.foxitsoftware.com>> Acesso em: 10/10/2011.

GOMES, M.C. **Crescimento com regulação em reprodutores contínuos**. Módulo 13.

GOPINATH, K.; KUMAR, S.; SINGH, S. Prevalence of mycobacteremia in Indian HIV-infected patients detected by the MB/Bact automated culture system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 27: 423-31, 2008.

GORDON, A. H.; D'ARCY HART, P. and YOUNG, M. R. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. **Nature**, 286, 79-82, 1980.

GRANGE, J. M.; ZUMLA, A. The global emergency of tuberculosis: what is the cause? **The Journal of The Royal Society for the Promotion of Health**; 122 (2), pp. 78-81, 2002.

GREEN, A.M.; Difazio, R.; Flynn, J.L. et al. IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**. 1;190(1):270-7, 2013.

GRUENHEID, S. & GROS, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. **Curr Opin Microbiol**. 3(1):43-8, 2000.

GUEMBE, L.; VILLARO, A.C. Histochemical Demonstration of Neuronal Nitric Oxide Synthase during Development of Mouse Respiratory Tract . **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**. Vol. 20, pp. 342–351, 1999

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L. S e PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HADAD, D. J.; IDE, J.; FERRAZOLI, L.; et al. Micobacterioses: recomendações para o diagnóstico e tratamento. **Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo**, Coordenadoria de Controle de Doenças. 2005.

HAHNTOW, I. N.; MAIRUHU, G.; VALKENGOED, I. G.M. V. et al. Are “functionally related polymorphisms” of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms associated with hypertension? **Cardiovascular Disorders**, v. 10, n.23, p: 1471-2261, 2010.

HALL, C.N. et al. What is the real physiological NO concentration *in vivo*? **Nitric oxide**, 15; 21(2):92-103, 2009.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Ann. Rev. Nutr**. 16:33– 50, 1996.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.**, 142(2): 231-55, 2004.

HANTA, I.; TASTEMIR-KORKMAZ, D.; DEMIRHAN, O.; HANTA, D.; KULECI, S.;SEYDAOGLU, G. et al. Association of the Nramp1 gene polymorphisms and clinical forms in patients with tuberculosis. **Bratisl Lek Listy**. 113(11):657-60, 2012.

HARFOUCH-HAMMOUD, E.I.; & DAHER, NA. Susceptibility to and severity of tuberculosis is genetically controlled by human leukocyte antigens. **Saudi Med J**, v.29, n.11, pp. 1625-1629, ISSN, 0379-5284, 2008.

HARRAP, S. B.; *et al.* The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. **Hypertension**, v.21, p:455-460, 1993.

HASHIMOTO, T.; PERLOT, T.; REHMAN, A.; TRICHEREAU, J. *et al.* ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. **Nature**, 487: 477-481, 2012.

HAYASHI, M.A.; CAMARGO, A.C.; The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon.**, v. 45, n.8 :1163-70 Jun, 2005.

HENDERSON, S. O.; HAIMAN, C. A. *et al.* Multiple Polymorphisms in the Renin- Angiotensin-Aldosterone System (ACE, CYP11B2, AGTR1) and Their Contribution to Hypertension in African Americans and Latinos in the Multiethnic Cohort. **Am J Med Sci.**; 328(5):266–273, 2004.

HEFFNER, J. A., and J. E. REPINE. 1989. State of the art: pulmonary strategies of antioxidant defense. **Am. Rev. Respir. Dis.** 140:531–554, 1989.

HENN, L. A. **Testemunha da tuberculose: antígeno liparabinomannan.** 2002. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas – Pneumologia, Rio Grande do Sul, 2002.

HIGAKI, J.; *et al.* Deletion allele of angiotensin-converting enzyme gene increases risk of essential hypertension in japanese men. The Suita Study. **Circulation**, v.101, p: 206-2065, 2000.

HIGUCHI, R. 1989. Using PCR to engineer DNA, p. 61-70. **In: PCR Technology.** H. A. Erlich (Ed.). Stockton Press, New York, N. Y.

HIJJAR, M. A. Controle das doenças endêmicas no Brasil: tuberculose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 27, p. 23-36. Suplemento, 1994.

HIJJAR, M. A.; PROCOPIO, M. J.; OLIVEIRA, R.; *et al.* A Tuberculose no Brasil e no mundo. **Boletim de Pneumologia Sanitária** - vol. 9, n. 2 - jul/dez – 2001.

HIJJAR, M.A e PROCÓPIO, M.J. Tuberculose – Epidemiologia e controle no Brasil. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 5, n. 2, p. 15-23, Julho / Dezembro de 2006.

HIJJAR, M.A. *et al.* Retrospecto do controle da Tuberculose no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 41, (Supl. 1) p: 50-58, 2007.

HILL, A. V. S. Aspects of Genetic Susceptibility to Human Infectious Diseases. **Annu. Rev. Genet.**, 40, p. 469–86, 2006.

HINGORANI, A. D.; LIANG, C. F.; FATIBENE, J.; *et al.* A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu2983Asp) Is a Major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. **Circulation**. 100:1515-1520, 1999.

HOLLA, L. I.; JURAJDA, M.; POHUNEK, P.; ZNOJIL, V. Haplotype analysis of the endothelial nitric oxide synthase gene in asthma. **Human Immunology**, 69, 306–313, 2008.

HOLLÁ, L.I.; BUCKOVÁ, D.; KUHROVÁ, V.; et al. Prevalence of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in patients with atopic asthma. **Clin Exp Allergy**, 32(8):1193-8, 2002.

HONAKER, R. W.; LEISTIKOW, R. L.; BARTEK, I. L. et al. Unique Roles of DosT and DosS in DosR Regulon Induction and *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy. **Infection and Immunity**, p. 3258–3263, Vol. 77, No. 8, 2009.

HOWARD, T. D.; GILES, W. H., et al. Promoter Polymorphisms in the Nitric Oxide Synthase 3 Gene Are Associated With Ischemic Stroke Susceptibility in Young Black Women. **Stroke**. 2005;36:1848-1851, 2005;

HUBERT, C.; HOUOT, A.M.; CORVOL, P. et al. Structure of the Angiotensin I-converting Enzyme Gene, two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. **Journal of biological chemistry**, Vol. 266, No. 23, Issue of August 15, pp. 15377-15383, 1991.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P.; Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, Issue 9, p. 2489–2491, 1987.

IGNARRO, L.J. Endothelium derivated relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. **Circ. Res.**, 61: 866-79, 1987.

INÁCIO, J.; GOULART FILHO, L. R.; VIEIRA, G. S. Frequências genotípicas e alélicas do gene do polimorfismo da ECA I/D na população brasileira. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.20, n.1, p. 47-51, Jan./Apr.2004.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Rev Bras Hipertens**, 8: 55-62, 2001.

JACOBS, W.R. JR.; TUCKMAN, M.; BLOOM, B.R. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. **Nature**, 327, p.532-535, 1987.

JALIL, J. E.; OCARANZA, M. P. Genotypes of the renin-angiotensin-aldosterone system: on the search of cardiovascular diseases. **Rev. Esp. Cardiol.**, 55(2):89-91, 2002.

JAYAPALAN, J. J.; MUNIANDY, S. AND CHAN, S. P. Null association between ACE gene I/D polymorphism and diabetic nephropathy among multiethnic Malaysian subjects. **Indian J Hum Genet**. May-Aug, 16(2): 78–86, 2010.

JEUNEMAITRE, X; LIFTON, HUNT, S.C.; et al. Absence of linkage between angiotensin enzyme locus and human essential hypertension. **Nature gene**, 1, p.72-5, 1992.

JORNAL LIVRE SEU ARTIGO NA WEB. **Tipos de afecções do pulmão**. www.drmarcoareliopaiva.com.br. Disponível em: <<http://www.jornallivre.com.br/157643/tipos-de-afeccoes-do-pulmao.html>>. Acesso em: 2 de janeiro de 2012. 13:23:44, 2012.

JOVANOVIĆ, A.; GRBOVIĆ, L.; TULIĆ, I. L- Arginine induces relaxation of human uterine artery with both intact and denuded endothelium. **European Journal of Pharmacology**. 256, p. 103-107, 1994.

KALLMANN, F., REISNER, D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. **Am Rev TUBERCULOSIS**, 47: 549–574, 1943.

KAPRIO, J. Science, medicine, and the future. Genetic epidemiology. **BMJ**, 320 (7244):1257-1259, 2000.

KAUFMANN, S.H.; BAUMANN, S.; NASSER, E.A. Exploiting immunology and molecular genetics for rational vaccine design against tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**. 10: 1068–1079, 2006.

KENDALL, S.L.; MOVAHEDZADEH, F.; RISON, S. C. G., et al. The *Mycobacterium tuberculosis* dosRS two-component system is induced by multiple stresses. **Tuberculosis** 84, 247-255, 2004.

KETTANEH, A.; SENG, L.; TIEV, KP.; TOLÉDANO, C.; FABRE, B.; CABANE, J. Human leukocyte antigens and susceptibility to tuberculosis: a meta-analysis of case-control studies. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.10, n.7, pp. 717-25, ISSN, 1027-3719, 2006.

KHARITONOV, S. A. ; BARNES, P. J.. Exhaled Markers of Pulmonary Disease. **Am J Respir Crit Care Med**. vol 163. pp 1693–1722, 2001.

KIECHLE, F. L. & MARLINSKI, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. **Am. J. Clin. Pathol.**, 100: 567- 75, 1993.

KINNULA, V. I.; CRAPO, J. D. and RAIVIO, K. O. Biology of disease. General and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung, **Lab Invest**. 73 (1): 3-19, 1995.

KITSIOS, G. D.; & ZINTZARAS, E. An NOS3 Haplotype is Protective against Hypertension in a Caucasian Population. **International Journal of Hypertension**.Article ID 865031, p. 1-7, 2010.

KLEIN, T. E. Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the Pharm GKB Project. **The Pharmacogenomics Journal**, 4, 2001.

KNAAP, R. V. D.; SIEMES, C.; COEBERGH, J. W. W.; et al. Renin-Angiotensin System Inhibitors, Angiotensin I-converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism, and Cancer. **Cancer**, 112:748–57, 2008.

KNOWLES, R.G. *et al.* Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 5159-62, 1989.

KONICKOVA-RADOCHOVA M, KONICEK J, MALEK L. The study of mutagenesis in *Mycobacterium phlei*. **Folia Microbiol.**,15:88-102, 1970.

KORSHUNOVA, T. Y.; AKHMETOVA, V. L.; KUTUEV, I. A. et al. Analysis of the VNTR Polymorphism at the *PAH* and *eNOS* Genes and the *CCR5* Gene Deletion in Populations of Northern Caucasus. **Russian Journal of Genetics**, vol. 40, no. 3, 2004, pp. 321–325. Translated from *Genetika*, vol. 40, no. 3, 2004, pp. 409–414, 2004.

KUCHAREWICZ, R.; PAWLAK, T. ;MATYS, E. ;et al. Angiotensin-1: an active member of the renin - Angiotensin system. **Journal of physiology and pharmacology**, 53, 4, 533.540, 2002.

KUMAR, A.; TOLEDO, J. C. PATEL, R. P. et al. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and Dos Tis a hypoxia sensor. **PNAS**. v. 104, n. 28, p: 11568-11573, julho, 2007.

KUMAR, R. ; NEJATIZADEH, A.; et al *The epistasis between vascular homeostasis genes is apparent in essential hypertension*. **Atherosclerosis**, vol. 220, nº2, pp. 418-424, 2012.

KUMAR, R. S.; KUSARI, J.; ROY, S. N., et al. Structure of Testicular Angiotensin-converting Enzyme. **J. Biol. Chem.** 264, 16754-16758, 1989.

KUMAR. A.; DESHANE, J. S.; CROSSMAN, D. K., et al. Heme oxygenase-1 derived Carbon Monoxide Induces the Mycobacterium tuberculosis Dormancy Regulon. **The Journal of Biological Chemistry** vol 283, No.26, pp. 18032-18039, June 27, 2008.

KWON C, et al. The Usefulness of Angiotensin Converting Enzyme in the Differential Diagnosis of Crohn's Disease and Intestinal Tuberculosis. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 22, p:1-7, 2007.

LAMPING, K.G.; NUNO, D.W.; SHESELY, E. G. et al. Vasodilator mechanisms in the coronary circulation of endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 279:H1906-H1912, 2000.

LANDAZURI, P.; GRANOBLAS, C.; LOANGO, N. Diferenças entre os Sexos na Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina e na Pressão Arterial em Crianças: um Estudo Observacional. **Arq Bras Cardiol**, 91(6):382-388, 2008.

LEE, S. K.; CHOI, H. I.; YANG, Y. S. et al. Nitric Oxide Modulates Osteoblastic Differentiation with Heme Oxygenase-1 via the Mitogen Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-kappaB Pathways in Human Periodontal Ligament Cells. **Biol. Pharm. Bull.** 32(8) 1328—1334, 2009.

LEE, J.M.; LO, A.C.; YANG, S.Y.; Association of Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism With Serum Level and Development of Pulmonary Complications Following Esophagectomy. **Annals of Surgery**, v. 241, n. 4, April, 2005.

LEE, Y. C.; CHEON, K. T.; LEE, H. B. et al Gene polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase and angiotensin-converting enzyme in patients with asthma. **Allergy**, v. 55, p: 959-963, 2000.

LEITE, C. Q. F.; TELAROLLI JR., R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.18, n.1, p. 17-28, 1997.

LEITE, J. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin.**, 18(2):87-94, 2003.

LEVINSON W, JAWETZ E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 631, 2005.

LEVY-FRÉBAUT, V.V; PORTAELS, F.; Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly *Mycobacterium* species. **Int. J. Syst. Bacteriol.** N. 42, p. 315-323, 1992.

LIMA, C. H. S.; BISPO, M. L. F.; DE SOUZA, M. V. N. Pirazinamida: Um Fármaco Essencial no Tratamento da Tuberculose. **Rev. Virtual Quim.** 3 (3), 159-180, 2011.

LIU, W.; CAO, W.C.; ZHANG, C.Y.; TIAN, L.; et al. VDR and NRAMP1 gene polymorphisms in susceptibility to pulmonary tuberculosis among the Chinese Han population: a case-control study. **Int J Tuberc Lung Dis.** 8(4):428-34, 2004.

LIU, P.T.; IOANNIDES, C.; SYMONS, A.M. and PARKE, D.V. Role of tissue glutathione in prevention of surgical trauma. **Xenobiotica**, 23, 899–911, 1993.

- LLOPART, I. T. **Biomarkers of oxidative stress in acute respiratory distress syndrome in exhaled breath measured online by mass spectrometry**. 2012. Tese (Doutorado em Medicina) – Departamento de Medicina, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, 2012
- LOMBARD, Z.; DALTON, DL.; VENTER PA, WILLIAMS RC, BORNMAN L. Association of HLADR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. *Hum Immuno*, v.67, n.8, pp. 643-654. ISSN, 0198- 8859, 2006.
- LOPES, A. J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; et al. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ* 2006;15(4):253-261, 2006.
- LU, X. M.; CHEN, G. J.; YANG, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme polymorphism affects outcome of local Chinese with acute lung injury. *Respiratory Medicine*, 105, 1485-1490, 2011.
- LUE, K.H.; KU, M. S.; LI, C.; et al. ACE gene polymorphism might disclose why some Taiwanese children with allergic rhinitis develop asthma symptoms but others do not. *Pediatr Allergy Immunol.*, v. 17, p: 508–513, 2006.
- LUIZON, M. R.; TOLEDO, T. C. I.; SIMOES, A. L. Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Haplotypes in Amerindians. *Dna and cell biology*, volume 28, number 7, 2009.
- LUNDBERG, A.C.; ÅKESSON, A. and ÅKESSON, B. Dietary intake and nutritional status in patients with systemic sclerosis. *Annals of Rheumatic Disease*, 51, 1143–1148, 1992.
- MACHADO, E. J. C. P. **Tuberculose no centro hospitalar Póvoa/Varzim/ Vila do Conde 2008/2009**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2010.
- MAGALHÃES, P. S. C.; BÖHLKE, M.; NEUBARTH, F. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC): codificação genética, bases estruturais e implicações clínicas. *Rev. Med. UCPEL*, Pelotas, 2(1): 54-59, 2004.
- MAHASIRIMONGKOL, S.; YANAI, H.; NISHIDA, N.; RIDRUECHAI, C, et al. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun*, 10: 77–83, 2009.
- MAIER LA, RAYNOLDS MV, YOUNG DA, et al. Angiotensin-1 converting enzyme polymorphisms in chronic beryllium disease. *Am J Respir Crit Care Med.*, 159:1342–1350, 1999.
- MAKINO, A.; NAKANISHI, T.; SUGIURA-OGASAWARA, M. et al.. No Association of C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase and an Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology*, 52: 60–66, 2004.
- MALAGRINO, P. A.; SPONTON, C. H. G.; et al. Prevalencia de dislipidemia em adultos de meia-idade com polimorfismo do gene NOS3 e baixa aptidão cardiorespiratória. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 57(1):33-43, 2013.
- MALIARIK MJ, RYBICKI BA, MALVITZ E, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and risk of sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1566 –1570, 1998.
- MANDINGAN, T. M.; MARTINKO, M. J.; PARKER, J. **Biología de los Microorganismos**. Madrid: Prentice Hall 2000.

MANUAL DA MAMA. A VACINA BCG. Nathércia Sena. **Disponível em:** <<http://manualdamama.blogspot.com.br/2012/07/e-quando-bcg-nao-inflama.html>>. Acesso em: 14 agosto, 10:11:25, 2012.

MANZANO, J. R.; MANTEROLA, J. M.; AUSINA, V.; SAURET, J. Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. **Arch. Bcopneumol.** n. 34, p. 154-157, 2005.

MARCH, M. F. B. P. **Tuberculose: histórico.** In: SANTA'ANNA, C. C. Tuberculose na infância e na adolescência. São Paulo: Atheneu, 2002.

MARCO, K. C. **Avaliação da interação entre os polimorfismos da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a biodisponibilidade sistêmica do óxido nítrico em indivíduos expostos ao mercúrio.** 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J.Biol.Chem.**, 268(17): 12231-4, 1993.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, 78: 927-30, 1994.

MARLETTA, M.A.; YOON, P.S.; IYENGAR, R. et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, v. 27, p: 8706-8711, 1988.

MARRE, M.; JEUNEMAITRE, X.; GALLOIS, Y.; et al. Contribution of Genetic Polymorphism in the Renin–Angiotensin System to the Development of Renal Complications in Insulin-dependent Diabetes. **J. Clin. Invest. The American Society for Clinical Investigation**, Inc. volume 99, n.7, 1585–1595, 1997.

MARRONI, A. S. **Diferenças étnicas na distribuição de variantes genéticas da sintase endotelial do óxido nítrico.** 2006. 58p. Tese (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARSDEN, P.A.; SCHAPPERT, K.T.; CHEN, H.S. et al.. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Lett.**, v.307, p: 287-293, 1992.

MARSDEN, P. A.; HENG, H.H.; SCHERER, S.W.; STEWART, R.J.; HALL A.V.; SHI, X.M.; TSUI, L.C, SCHAPPERT, K.T. Structure and cromossomal localization of the humam constitutive endothelial nitric oxide syntase gene. **Journal of Biological Chemical**, v.268, n. 23, p.17478-17488, aug. 1993.

MARSHALL, R.P.; WEBB, S.; BELLINGAN, G. J.; Angiotensin Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Is Associated with Susceptibility and Outcome in Acute respiratory Distress Syndrome. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.166, p: 646–650, 2002.

MARSON, F. A. L.; BERTUZZO, C. S.; HORTENCIO, T. D. R.; et al The ACE gene D/I polymorphism as a modulator of severity of cystic fibrosis. **BMC Pulmonary Medicine**, 12:41, 2012.

MARTINS, H. H. O. **Polimorfismo de inserção/deleção do gene da Enzima conversora de angiotensina I (ECA) no município de Porto Velho (RO).** 45 f. Monografia. (Bacharelado em Ciências Biológicas) Departamento de Biologia, Universidade Federal de Rondônia – UNIR, 2011.

MASCHMANN, R.A. **Desenvolvimento de um teste colorimétrico para detecção de resistência à Rifampicina em isolados de *Mycobacterium tuberculosis*.** 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em

Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MATOS, M.F.D. **Polimorfismos dos genes da ECA, Angiotensinogênio e do Receptor tipo 1 da Angiotensina II e pressão arterial.** 2006. Tese (Doutorado em cardiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

MATTEI, M.G.; HUBERT, C.; ALHENC-GELAS, F. . et al. Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. (Abstract) **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 51, p: 1041, 1989.

MEILANG, Q.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; ZHAO, Y. et al. Polymorphisms in the *SLC11A1* gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update. **INT J TUBERC LUNG DIS** 16(4):437–446. 2012.

MENDONÇA, I.; FREITAS, I. A.; SOUSA, C. A.; et al .Polimorfismos do Gene da ECA e Risco de Doença Coronária numa População Portuguesa. **Rev Port Cardiol.**, 23 (12), p.1593-1601, 2004.

MENZIES, D.; PAI, M.; COMSTOCK, G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. **Ann Intern Med**, n.146, p.340-354, 2007.

MERZA, M.; FARNIA, P.; ANOOSHEH, S.; VARAHRAM, M. et al .The NRAMP 1, VDR and TNF- α Gene Polymorphisms in Iranian Tuberculosis Patients: The Study on Host Susceptibility. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 13(4):252-256, 2009.

MESTRE, O. M. E. ***Mycobacterium tuberculosis* host adaptation and evolution reflected by defense mechanisms against oxidative stress.** 2012. 156 p. Tese (Doutorado em Farmácia-Microbiologia), Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

METCHOCK, B., NOLTE, F. S. & WALLACE, R. J., JR. Mycobacterium. In Manual of Clinical Microbiology. Manual of Clinical Mycobacteriology. **American Society for Microbiology**, 7th Edition, p: 399–437, 1999.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D.C.; MARRONI, A. S.; et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. **Pharmacogenetics and Genomics**, 15:565–570, 2005.

METZGER, I. F.; SERTORIO, J. T. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Modulation of nitric oxide formation by endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes. **Free Radical Biology and Medicine**.V. 43, n. 6, p: 987-992, 2007.

MEYERFREUND, D. **Estudo da Hipertensão Arterial e de outros fatores de risco cardiovascular nas comunidades indígenas do Espírito Santo – BR .** 2006. 123p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Programa de pós-graduação em ciências fisiológicas, Centro de ciências da saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias.** GUIA DE BOLSO 3ª Edição, Vol. I, Série B. Textos Básicos de Saúde, BRASÍLIA / DF, JUNHO – 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de controle da Tuberculose, Uma proposta de Integração ensino-serviço.** 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose** Disponível em:

<<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/tuberculose/bases/tubercbrnet>> Acesso em: 23. Ago. 2012. 17:17:15.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose na Atenção Primária à Saúde**. 1ª ed. Ampliada, 180p. Porto Alegre, março de 2011.

MIRANDA-VILELA, A. L.; AKIMOTO, A.K.; ALVES, P.C.Z.; et al. Evidence for an association between haptoglobin and MnSOD (Val9Ala) gene polymorphisms in essential hypertension based on a Brazilian case-control study. *Genetics and Molecular Research* 9 (4): 2166-2175, 2010.

MOHOLISA, R. R.; RAYNER, B. R.; et al. Association of B2 Receptor Polymorphisms and ACE Activity with ACE inhibitor-induced Angioedema in Black and Mixed-Race South Africans. *The Journal of Clinical Hypertension*, vol. 15, nº 6, 413-419, 2013.

MOHAMMADI, F.; SHAHABI, P.; ZABADI, S.; AA, Z. Insertion/Deletion gene polymorphism and serum level of angiotensin converting enzyme. *National Research Institute of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 7, n.2, p: 18-22, 2008.

MONCADA, S. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor : identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2495-501, 1988.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews*, 43(2): 109-42, 1991.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329(27): 2002-2012.

MONTEIRO, C. L. B.; COGO, L. L.; GALARDA, I.; BORTOLOZZI FILHO, F. C. **Microbiologia Médica, Manual Teórico-prático de procedimentos básicos em Microbiologia Médica**. Departamento de patologia básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MORAES, C. F. **Associação dos polimorfismos dos genes ECA e AT1R com a hipertensão arterial e a resposta a terapêutica anti-hipertensiva em idosos brasileiros**. 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia) – Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Gerontologia. Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2008.

MORRISON CD, PAPP AC, HEJMANOWSKI AQ, et al. Increased D allele frequency of the angiotensin-converting enzyme gene in pulmonary fibrosis. *Hum Pathol.*, 32:521–528, 2001.

MUNHOZ, T.P. *et al.* Genotipo DD da enzima conversora de angiotensina (ECA): relação com trombose venosa. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [S.l], v. 27, n. 2, p. 87-90, 2005.

MURPHEY, L. J. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism Modulates the Human In Vivo Metabolism of Bradykinin. *Journal of the American Heart Association*, v. 102, p: 829-832, 2000.

MURRAY, C. J. L. & SALOMON, J. A. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 95, p. 13881–13886, 1998.

NACAK, M.; NACAKC, I.; SXANLID, M.; et al. Association of angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism with lung cancer in Turkey. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 198, 22-26, 2010.

NADAUD, S., BONNARDEAUX, A., LATHROP, M., & SOUBRIER, F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 198, 1027-1033, 1994.

NAGASE, S.; SUZUKI, H.; WANG, Y. et al. Association of ecNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. **Mol. Cell. Biochem.** 2003; 244: 113–18, 2003.

NAKANE, M., SCHMIDT, H. H., POLLOCK, J. S. et al. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Lett.** 316, 175-180, 1993.

NAKAYAMA, M.; YASUE, H.; YOSHIMURA, M.; et al. T-786C Mutation in the 5'-Flanking Region of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Is Associated With Coronary Spasm. **Circulation.** 99:2864-2870, 1999.

NAZAROV, I. B.; WOODS, D. R.; MONTGOMERY, H. E.; et al. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. **European Journal of Human Genetics**, v. 9, p: 797-801, 2001.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; LAPA e SILVA, J. R. et al. Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, 183: 2293-302, 1996.

NIEMANN, S., RICHTER, E., RUSCH-GERDES, S. "Biochemical and genetic evidence for the transfer of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to the species Mycobacterium bovis Karlson and Lessel 1970 (Approved Lists 1980) as Mycobacterium bovis subsp. caprae comb. nov.". **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 52, p: 433-436, 2002.

NIU, T., CHEN, X. & XU, X. Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications. **Drugs**, 62, 977-93, 2002.

O'DONNELL CJ, LINDPAINTNER K, LARSON MG, et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 97, p: 1766-72, 1998.

OGARKOV, O.B.; SIN'KOV, V.V.; MEDVEDEVA, T.V. et al. Polymorphism of genes of the renin-angiotensin system ACE, AT1R, and AT2R in patients with pulmonary tuberculosis. **Mol Gen Mikrobiol Virusol.**, (2):12-8, 2008.

OLIVEIRA, C. **DOENÇAS INFECCIOSAS, O desafio da Clínica.** Clínica Universitária de Doenças Infecciosas, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2008

OLIVEIRA, F. G. **Influência do tratamento com captopril, losartan, Furosemida e isoproterenol durante a gestação e Lactação de ratas, no comportamento ingestivo dos Filhotes e da prole adulta.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de veterinária. Universidade federal rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA, H. B. ; FILHO, D. C. M. Abandono de tratamento e recidiva da tuberculose: aspectos de episódios prévios, Campinas, SP, Brasil, 1993-1994. **Rev Saúde Pública**, 34(5):437-43, 2000.

OLIVEIRA, Y. P. A. **O papel de ROS (espécies reativas de oxigênio) na exacerbação da resposta inflamatória na sepse.** 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

OPARIL, S.; WEBER, A. M. Hipertensão: El Riñón, de Brenner y Rector. Ed: **McGraw-Hill Interamericana** año, 1-4, 77-94, 2004.

PABST, S.; THEIS, B.; GILLISSEN, A.; et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease. **Eur J Med Res**, 14 (Suppl. IV): 177-181, 2009.

PAI, M.; JOSHI, R.; BANDYOPADHYAY, M.; NARANG, P.; DOGRA, S.; TAKSANDE, B.; KALANTRI, S. Sensitivity of a whole-blood interferon-gamma assay among patients with pulmonary tuberculosis and variations in T-cell responses during anti-tuberculosis treatment. **Infection**, 35(2):98-103, 2007.

PAN, M., et al. Angiotensin-Converting Enzyme Gene 2350 G/A Polymorphism Is Associated with Left Ventricular Hypertrophy but Not Essential Hypertension. **Hypertension Research**, [S.l], v. 30, n. 1, p. 31-37, 2007.

PANAGIOTOPOULOS, S.; SMITH, T. J.; ALDRED, G.P. et al. Angiotensin-converting-enzyme (ACE) gene polymorphism in tipe II diabetic patients with increased albumin excretion rate. **Journal of Diabetes and its complications**, v. 9, n. 4, p: 272-276, outubro-dezembro, 1995.

PARDONO, E.; ALMEIDA, M.B.; BASTOS, A. A. et al.; Hipotensão pós-exercício: possível relação com fatores étnicos e genéticos. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 14(3):353-361, 2012.

PARENICA, J.; GOLDBERGOVA, M. P.; KALA, P.; et al. ACE gene insertion/deletion polymorphism has a mild influence on the acute development of left ventricular dysfunction in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary PCI. **Cardiovascular Disorders**, 10:60, 2010.

PARK, H. D.; GUINN, K, M.; HARRELL, M. I.; LIAO, R. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**. 2003 May ; 48(3): 833–843, 2003.

PARKE, A.L.; IOANNIDES, C.; LEWIS, D.F.V. and PARKE, D.V. Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, 1, 3–36, 1991.

PARKE, D. V. **Nutritional antioxidants and disease prevention: Mechanisms of action**. Division of Molecular Toxicology School of Biological Science, Universit of Surrey, Guildford, UK, 1999.

PAVLIC, S. D.; RISTIC, S.; FLEGO, V.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Polymorphism in Lung Cancer Patients. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v.16, n.7, 2012.

PAYNE, S. S.; DHAMRAIT, P.; GOHLKE, J. et al. The Impact of ACE Genotype on Serum ACE Activity in a Black South African Male Population. **Annals of Human Genetics**, 2007.

PEMBERTON, PREMIO. **O polimorfismo da posição Íntron 4b/a do gene NOS3 atenua a resposta da pressão arterial frente ao exercício físico aeróbio independente da presença de síndrome metabólica: um estudo crossover e duplo cego**. 2013. 73 f., 2013.

PEREIRA, A. C.; MOTA, G. F. A. et al. Angiotensinogen 235T Allele “Dosage” Is Associated With Blood Pressure Phenotypes. **Hypertension**, 41:25-30, 2003.

PEREIRA, J. F. **Análise de polimorfismos de inserção *ALU* como marcadores de ancestralidade em estudo caso-controle de coronariopatas do estado da Bahia.** 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

PERICH, R.B.; JACKSON, B.; ROGERSON, F. M.; et al. Two binding sites on angiotensin converting enzyme: evidence from radioligand binding studies. **Molecular Pharmacol**, 42: 286-293, 1992.

PICCOLI, J.C.E. **Estudo associativo entre três polimorfismos (-786T>C, 894G>T e VTNR intron 4 a/b) no gene que sintetiza para óxido nítrico sintase endotelial e síndrome coronária aguda.** 2007. 67p. Tese (Doutorado em Biologia celular e Molecular)-Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PICON, P. D.; RIZZON, C. F. C.; OTT, W. P. **Tuberculose:** epidemiologia, diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, 1993.

PIDDINGTON, D.L.; FANG, F.C.; LAESSIG, T.; COOPER, A. M.; ORME, I. M.; BUCHMEIER, N. Cu, Zn superoxide dismutase of Mycobacterium tuberculosis contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst. **Infect Immun.**, 69:4980-7, 2001.

PIETINALHO A, FURUYA K, YAMAGUCHI E, et al. The angiotensin-converting enzyme DD gene is associated with poor prognosis in Finnish sarcoidosis patients. **Eur Respir J**. 13:723–726, 1999.

PLUNKETT, A.; AGBEKO, R. S. et al. Angiotensin-converting enzyme D allele does not influence susceptibility to acute hypoxic respiratory failure in children. **Intensive Care Med**. 34:2279-2283, 2008.

PULLA REDDY B. et al. Angiotensin-converting enzyme gene variant and its levels: risk factors for myocardial infarction in a South Indian population. **Singapore Med J**, v. 51, n. 7, p: 576-581, 2010.

QI, Z.; SY, S.; SF, C.; DF, G. Association study of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with essential hypertension in northern Han Chinese. **Chinese Medical Journal**, v. 119, p: 1065-1071, 2006.

RAHMAN, N., SEAL, S., THOMPSON, D., KELLY, P., RENWICK, A., ELLIOTT, A., REID, S., SPANOVA, K., BARFOOT, R., CHAGTAI, T., et al. **Nat. Genet.** Published online December 31, 2006. 10.1038/ng1959, 2006.

RAMÍREZ-PRIETO, M.T.; GARCÍA-RÍO, F.; VILLAMOR, J. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. **Med Clin (Barc)**., Sep 16;127(10):386-96, 2006.

RAMU, P.; UMAMAHESWARAN, G.; SHEWADE, D.G.; et al. Candidate Gene Polymorphisms of Renin Angiotensin System and Essential Hypertension in a South Indian Tamilian Population. **Int J Hum Genet**, v. 11, n.1, p: 31-40, 2011.

RAPOPORT, R.M. & MURAD, F. Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ. Res.**, 52: 352-7, 1983.

RAVIKUMAR, M.; DHEENADHAYALAN, V.; RAJARAM, K.; LAKSHMI, S.S.; et al. Associations of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 alleles with pulmonary tuberculosis in south India. **Tuber Lung Dis**, v.79, n.5, pp. 309-317, ISSN, 0962-8479, 1999.

RAYMOND M. & ROUSSET F, 2011. **GENEPOP on the web (version 4.1): population genetics software for exact tests and ecumenicism.** Disponível em: <http://genepop.curtin.edu.au/help_input.html#Input>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2012. 23:51:31.

REGO, M. F. F. **Inibidores da renina no tratamento da hipertensão arterial.** 2009. 25 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Universidade do Porto, Porto, 2009.

REMUS, N.; ALCAIS, A.; ABEL, L.; Human genetics of common Mycobacterial infections. **Immunologic Research**, 28/2: 109-129, 2003.

RIBEIRO, J. M. e FLORENCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Rev Bras Hipertens.**, 3: 293-302, 2000.

RICCIARDOLO, F. L.M.; STERK, P. J.; GASTON, B. et al. Nitric Oxide in Health and Disease of the Respiratory System. **Physiol Rev.** vol 84, july 2004, 731-765.

RIEDER, M. J., TAYLOR, S. L., CLARK, A. G. & NICKERSON, D. A. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. **Nat Genet**, 22, 59-62, 1999.

RIGAT, B.; HUBERT, C. et al. An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I converting Enzyme Gene Accounting for half the variance of Serum Enzyme Levels. **Genetic Control of Serum Angiotensin I-converting enzyme**, v. 86, p: 1343-1346, 1990.

RIGOLI, L.; CHIMENZ, R.; DI BELLA, C.; et al. Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensin Type 2 Receptor Gene Genotype Distributions in Italian Children with Congenital Uropathies. **Pediatric research**, vol. 56, n. 6, 2004.

ROBERTS, D. M.; LIAO, L. P.; WISEDCHASRI, G. et al. Two Sensor Kinases Contribute to the Hypoxic Response of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**. vol.279, nº. 22, Issue of May 28, pp.23082-23087, 2004.

ROLA, M. G. & FERREIRA, L. B. **Polimorfismos genéticos associados à hipertensão arterial sistêmica.** Univ. Ci. Saúde, Brasília, v. 6, n. 1, p. 57-68, jan./jun. 2008.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. **Boletim de Pneumologia Sanitária** – vol. 9 – nº 1 – jan/jun – 2001.

ROSEMBERG, J. Tuberculose - aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, v. 7, n. 2 – jul/dez – 1999.

ROTIMI, C.; PURAS, A.; COOPER, R.; et al. Polymorphisms of Renin-Angiotensin Genes Among Nigerians, Jamaicans, and African Americans. **Hypertension**. 27: 558-563, 1996.

ROW-MILK-FACTS.COM. **Tuberculose.** Disponível em: < <http://www.raw-milk-facts.com/tuberculosis.html>>. Acesso em: 6 de março de 2012. 8:10:18.

SABADINI, R. G. **Patologia e diagnóstico da tuberculose bovina: uma revisão.** 2009. 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Curso de Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Universidade Castelo Branco, Cachoeiro de Itapemirim, 2009.

SADKI, K.; BAKRI, Y.; TIJANE, M.; and AMZAZI, S. **MHC Polymorphism and Tuberculosis Disease**. University Mohammed V-Agdal, Faculty of Sciences, p. 343-356, 2012.

SALZANO, F. M.; HUTZ, M. H. Genética, genômica e populações nativas brasileiras – história e biomedicina. **Revista de Estudos e Pesquisa**, FUNAI, Brasília, v.2, n.1, p.175-197, jul. 2005.

SAMPAIO, M. F. **Função endotelial em adultos jovens com infarto do miocárdio. Influências ambientais e genéticas**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SÁNCHEZ, A. R.; MASSARI, V.; GERHARDT, G.. et al. A tuberculose nas prisões do Rio de Janeiro, Brasil: uma urgência de saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23(3):545-552, mar, 2007.

SANDRIM, V. C.; PALEI, A. C.T.; SERTORIO, J. T.; et al. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. **Molecular Human Reproduction**, Vol.16, No.7 pp. 506–510, 2010.

SANJULIANI, A. F.; TORRES, M. R. S. G.; PAULA, L. N.et al. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. **Hipertensão Arterial**, vol. 10 , n. 3, 2011.

SANKAR, M.M.; SINGH, J.; DIANA, S.C.; SINGH, S. Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from North Indian patients with extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**. 93(1):75-83, 2012.

SANTOS, K. G.; CRISPIMC, D.; CANANI, L. H. Association of eNOS gene polymorphisms with renal disease in Caucasians with type 2 diabetes. **Diabetes research and clinical practice**, 91, p. 353–362, 2011.

SASSETTI, C.M.; BOYD, D.H.; RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Mol Microbiol**, 48:77-84, 2003.

SAYED-TABATABAEI, F. A., OOSTRA, B. A., ISAACS, A., VAN DUIJN, C. M. & WITTEMAN, J. C. ACE polymorphisms. **Circ Res**, 98, 1123-33, 2006.

SCHLESINGER, L. S.; BELLINGER-KAWAHARA, C. G.; PAYNE, N. R. and HORWITZ, M. A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **J. Immunol**. 150, 2920-2930, 1990.

SCHLUGER, N. S.; ROM, W.N. The Host Immune Response to Tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**. vol 157. p. 679–691, 1998.

SCHMAIER, A. H. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 285: R1–R13, 2003.

SCHROEDER, E. K. **Efeito das mutações I16T, I21V, I47T e S94A na afinidade da enzima 2-trans-Enoil-ACP (CoA) Redutase de Mycobacterium tuberculosis pelo cofator NADH: Estudos por simulação pela dinâmica molecular e docking molecular**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em biologia celular e molecular, Centro de Biotecnologia da UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SEISCENTO, M.; CONDE, M. B.; DALCOLMO, M. M. P. Tuberculose pleural. **J. bras. pneumol.** vol.32 suppl.4 São Paulo Aug. 2006

SEN, F.; DEMIRTURK, M.; ABACI, N.; et al. Endothelial nitric oxide synthase intron 4a/b polymorphism and early atherosclerotic changes in hypopituitary GH-deficient adult patients. **European Journal of Endocrinology**, 158, 615–622, 2008.

SEOANE, C. E. S. Efeitos da Fragmentação Florestal sobre a Genética de Populações de Guarantã. **ISSN**, 1679-2599 Outubro, 2007.

SERRANO, N. C.; DÍAZ, L. A.; CASAS, J. P. Frequency of eNOS polymorphisms in the Colombian general population. **BMC Genetics**, 11:54, 2010.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**; 17 (2) : 227-36, 2004. doi: 10.1590/S1415-52732004000200009.

SHANKAR, R.R.; ECKERT, G.J.; SAHA, C.; TU, W.; PRATT, J.H. The Change in Blood Pressure during Pubertal Growth. **J Clin Endocrinol Metab**, 90: 163–167, 2005.

SHARMA, S.K.; MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **Indian J Med Res**, 120: 316-53, 2004.

SHARMA, P. R.; SINGH, S.; JENA, M.; MISHRA, G. et al. Coding and non-coding polymorphisms in VDR gene and susceptibility to pulmonary tuberculosis in tribes, castes and Muslims of Central India. **Infect Genet Evol.**11(6):1456-61, 2011.

SHAUL, P. W.; NORTH, A. J.; BRANNON, T.S.; et al. Prolonged in vivo hypoxia enhances nitric oxide synthase type I and type III gene expression in adult rat lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, 13(2):167-174, 1995.

SHAW, M. A.; COLLINS, A.; PEACOCK, C. S., MILLER, E. N.; et al. Evidence that genetic susceptibility to Mycobacterium tuberculosis in a Brazilian population is under oligogenic control: linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TNFA. **Tuberc Lung Dis**, 78: 35–45, 1997.

SHERMAN, T. S.; CHEN, Z.; YUHANNA, I. S. et al. . Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 276:L383-L390, 1999.

SHI, GL.; HU, XL.; YANG, L.; RONG, CL.; GUO, YL.; SONG, CX. Association of HLA-DRB alleles and pulmonary tuberculosis in North Chinese patients. **Genet Mol Res**, v.10, n.3, pp. 1331-1336, **ISSN** 1676-5680, 2011.

SHILOH, M.U. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Senses Host-derived Carbon Monoxide during Macrophage Infection. **Cell Host & Microbe** 3, 323-330, May 2008.

SHIN, Y. S.; BAEK, S. H.; CHANG, K. Y. et al. Relations between eNOS Glu298Asp polymorphism and progression of diabetic nephropathy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 65, p.257–265, 2004.

SHINNICK, T.M; KING, C.H.; SAINI, D.K.; et al. Molecular biology, virulence and pathogenicity of mycobacteria. **The American Journal of Medical Sciences**, v. 309, n. 2, p: 92-98, fevereiro, 1995.

SHOJI, M.; TSUTAYA, S.; SAITO, R. et al.. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. **Life Sciences**, Vol. 66, No. 26, pp. 2557-2562, 2000.

SIASOS, G.; TOUSOULIS, D.; ANTONIADES, C.; et al. L-arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis? **International Journal of Cardiology**, v. 116, p: 300-308, 2007.

SIES, H.; Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.**, 91, S31, 1991.

SILVA, B. M.; NEVES, F. J.; ROCHA, N. G. Endothelial nitric oxide gene haplotype reduces the effect of a single bout of exercise on the vascular reactivity in healthy subjects. **Translational Research**, 161, p.15–25, 2013.

SILVA, A. L. P. **Associação entre o polimorfismo Inserção/Delecção da Enzima Conversora da Angiotensina na Diabetes mellitus tipo 2: estudo da população portuguesa**. 2011. 102p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde) – Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 2011.

SILVA, D. C. & CERCHIARO, G. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Quim. Nova**, vol. 34, n. 2, 300-305, 2011.

SILVA, T. C. **Associação da alfa-1-antitripsina com tuberculose pulmonar**. 2010. 74f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental com ênfase em genética) - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia – CIBEBI, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2010.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural, Santa Maria**. v.40, n.4, p.994-1002, abr, 2010.

SKAMENE, E.; SCHURR, E.; GROS, P. Infection genomics: *Nramp1* as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. **Annu. Rev. Med.**, v.49, p.275-87, 1998.

SLADEK, S. M.; MAGNESS, R. R.; CONRAD, K. P. Nitric oxide and Pregnancy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 272:R441-R463, 1997.

SMITH, J. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev**. 16:463-96, 2003.

SOUSA, M. V. N. A tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em Far-Manguinhos (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro. **Rev. Virtual Quim. RJ**, 1 (1), 9-16, 2009.

STEAD, W. W. The origin and erratic global spread of tuberculosis: how the past explains the present and is the key to the future. **Clin Chest Med**, 18, p.65–77, 1997.

STEAD, W.W. Genetics and resistance to tuberculosis: could resistance be enhanced by genetic engineering? **Ann Intern Med**, 116, p.937–941, 1992.

STEIN, C. M. Genetic Epidemiology of Tuberculosis Susceptibility: Impact of Study Design. **Plos Phatogens**, Issue 1, v.7, 2011.

STEIN, C. M.; NSHUTI, L.; CHIUNDA, A. B.; et al. Evidence for a major gene influence on tumor necrosis factor-alpha expression in tuberculosis: path and segregation analysis. **Hum Hered** 60: 109–118, 2005.

STEINBRENNER, H.; SIES, H.; Protection against reactive oxygen species by seleno-proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 1478, 2009.

STERLING, T.R.; DORMAN, S.E.; CHAISSON, R.E.; DING, L.; HACKMAN, J.; MOORE, K.; HOLLAND, S. M. Human immunodeficiency virus-seronegative adults with extrapulmonary tuberculosis have abnormal innate immune response. *Clin Infect Dis*. 33: 976-82, 2001.

SUN, Y.; FANG, M.; NIU, W. et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms Associated with Susceptibility to High Altitude Pulmonary Edema in Chinese Railway Construction Workers at Qinghai-Tibet over 4 500 Meters above Sea Level. *Chin Med Sci J*, 25(4):215-221, 2010.

SUNG-KI-JUNG et al. An Angiotensin I Converting Enzyme Polymorphism is Associated with Clinical Phenotype When Using Differentiation-Syndrome to Categorize Korean Bronchial Asthma patients. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. V. 2011, 1-6, ID 498138, 2011.

SURYANARAYANA, V.; RAO, L.; KANAKAVALLI, M.; PADMALATHA, V. et al. Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene Polymorphisms. *Arch Gynecol Obstet*. 274: 119–124, 2006.

TAI, S. C., ROBB, G. B., & MARSDEN, P. A. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 24, 405-412, 2004.

TE BEEK, LAM.; VAN, DER WERF, M. J.; RICHTER, C.; BORGDORFF, M. W. Extrapulmonary tuberculosis by nationality, the Netherlands, 1993-2001. *Emerg Infect Dis*. 12:1375-82, 2006.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J Bras Pneumol*. 33(3):323-334, 2007.

TESAURO, M.; THOMPSON, W.C.; ROGLIANI, P. et al. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: Cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *PNAS*, p. 2832–2835, vol. 97, n.6, 2000.

TING, E. L. M.; KIM, A. C.; CATTAMANCHI, A. and JOEL, D. Inhibiting Activation of STAT1 Transcriptional Responses Without *Mycobacterium tuberculosis* Inhibits IFN- γ . *J Immunol*, 1999; 163:3898-3906, 1999.

TIPNIS, S. R., HOOPER, N. M., HYDE, R., KARRAN, E., CHRISTIE, G., TURNER, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme: cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem*. 275: 33238-33243, 2000.

TIRET, L.; RIGATT, B.; VISVIKIS, S. Evidence, from Combined Segregation and Linkage Analysis, That a Variant of the Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) Gene Controls Plasma ACE Levels. *Am. J. Hum. Genet*. 51:197-205, 1992.

TKÁCOVÁ, R.; JOPPA, P.; STANCÁK, B.; et al. The link between angiotensin-converting enzyme genotype and pulmonary artery pressure in patients with COPD*. *Wien Klin Wochenschr*, 117/5–6: 210–214, 2005.

TODAR, K. *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*. Online Textbook of Bacteriology, 2008-2012. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis_2.html>. Acesso em: 10 jan. 2012. 1:02.

TOPPER, J. N., CAI, J., FALB, D., & GIMBRONE, M. A., JR. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 93, 10417-10422, 1996.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8º ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbriologia**. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2008.

TSUKADA, T.; YOKOYAMA, K.; ARAI, T. TAKEMOTO, F. HARA, S. YAMADA, A. et al. Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. **Biochem Biophys Res Commun**, 245:190, 1998.

ULRICH, S.; HERSBERGER, M.; FISCHLER, M.; et al. Genetic Polymorphisms of the Serotonin Transporter, but Not the 2a Receptor or Nitric Oxide Synthetase, Are Associated with Pulmonary Hypertension in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Respiration**; 79: 288–295, 2010.

UNIPROT CONSORTIUM. **Species Mycobacterium tuberculosis**. Disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/1773>. Acesso em 19 de fev. 8:05:43, 2012.

VALANCE, P. & MONCADA, S. Nitric oxide – from mediator to medicines. **Journal of the Royal College of Physicians**, London 28, 209–219, 1994.

VALENZUELA, M.T.; G. M. ORYAN.; Logros y desafios del programa Ampliado de Inmunizaciones em la Región de las Américas. **Revista Médica do Chile**, v. 128, n. 8, p: 911-922, Santiago, ago, 2000.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interac.** vol. 160, p. 1- 40, 2006.

VAN DER KNAAP, R.; SIEMES, C.; JAN-WILLEM, M. D. W; et al. Coebergh.Renin-Angiotensin System Inhibitors, Angiotensin I-converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism, and Cancer. **Cancer**, 112:748–57, 2008.

VANIN, A. F.; SELITSKAYA, R. P.; SEREZHENKOV, V. A. et al. Direct EPR Detection of Nitric Oxide in Mice Infected with the Pathogenic Mycobacterium *Mycobacterium tuberculosis*. **Appl Magn Reson** (2010) 38:95–104, 2010.

VAN-LUME, D. S. M. **Diagnóstico imunológico da tuberculose infantil utilizando os antígenos recombinantes ESAT-6 E CFP-10**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

VARGAS, A. E.; SILVA, M. A. L.; SILLA, L. et al. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. **Tissue Antigens**, 66 (2005) 683–690, 2005.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; SILVA, M. A. M.; GOMES, A. C. M.; Hipótese oxidativa da hipertensão arterial: uma mini-revisão. **Rev. Bras. Hipertensão**, v.14, (4): p.269-274, 2007.

VELEZ, D.R.; HULME, W. F.; MYERS, J. L., et al. Association of SLC11A1 with tuberculosis and interactions with NOS2A and TLR2 in African-Americans and Caucasians. **Int. J. Tuberc Lung Dis** 13(9):1068-1076, 2009.

VELLOSO, E.P.; VIEIRA, R.; CABRAL, A.C. et. al. Reduced plasma levels of angiotensin-(1-7) and renin activity in preeclamptic patients are associated with the angiotensin I-converting enzyme deletion/deletion genotype. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** (2007) 40: 583-590, 2007.

VENDRAMINI, S. H. F.; SANTOS, M. L. S. G.; GAZETTA, C. E. et al. Tuberculosis risks and socio-economic level: a case study of a city in the Brazilian south-east, 1998–2004. **Int. J. Tuberc. lung dis.** 10 (11) :1231–1235, 2006.

VERZA, M. **Detecção da mutação mais frequente no códon 315 do gene katG relacionado com resistência a isoniazida em isolados de *Mycobacterium tuberculosis***. 120 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expressão das óxido nítrico sintetases na Fisiopatologia das doenças cardiovasculares. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.74, n.4, 2000.

VIGANO, A.; TRUTSCHNIGG, B.; KILGOUR, R. D. et al. Relationship Between Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism and Body Composition, Functional Performance, and Blood Biomarkers in Advanced Cancer Patients. **Clin Cancer Res.** 15(7) April 1, 2009.

VIJAYA LAKSHMI, V.; RAKH, SS.; ANU RADHA, B.; HARI SAI PRIYA, V.; PANTULA, V.; JASTI, S.; SUMAN LATHA, G.; MURTHY, KJ. Role of HLA-B51 and HLA-B52 in susceptibility to pulmonary tuberculosis. **Infect Genet Evol**, v.6, n.6, pp. 436-439, **ISSN**, 1567-1348, 2006.

VILLAR, J.; FLORES, C.; PÉREZ-MÉNDEZ, L.; et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, 34 : 488 – 495, 2008.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B.; Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.**, 47, 409, 2000.

VOSKUIL, M. I.; SCHNAPPINGER, D.; VISCONTI, K. C.; Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. **The Journal of Experimental Medicine**, Volume 198, Number 5, September 1, 705–713, 2003.

WAKSMAN, S.A. The conquest of tuberculosis. Berkeley: University of California, 1964.

WANG Y, KIKUCHI S, SUSUKI H. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in intron 4 affects the progression of renal failure in non-diabetic renal diseases. **Nephrol. Dial. Transplant.**; 14: 2898–902, 1999.

WANG, F.; FANG, Q.; YU, N.; ZHAO, D., et al. Association between genetic polymorphism of the angiotensin-converting enzyme and diabetic nephropathy: a meta-analysis comprising 26,580 subjects. **Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System**, 1–14, 2011.

WANG, J.; DUDLEY, D.; WANG, X.L. Haplotype-specific effects on endothelial NO synthase promoter efficiency, Arterioscler. **Thromb. Vasc. Biol.** 22, e1–e4, 2002.

WANG, R.; ZAGARIYA, A.; IBARRA-SUNGA, O.; et al. Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 276:L885-L889, 1999.

WATKINS, D. N., D. J. PERONI, K. A. BASCLAIN, M. J. GARLEPP, AND P. J. THOMPSON. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 629–639, 1997.

WEBB, A. C.; AURON, P.E.; RICH, A.; et al. “Cellular and molecular biology of lymphokines” (C. Sorg and A. Schimpl, ed.), pp. 685-695. **Academic Press New York**, 1985.

WEI, L.; ALHENC-GELAS, F.; CORVOL, P. et al.. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem.*, 266: 9002-9008, 1991.

WEINBERGER, B.; HECK, D.; LASKIN, D. L. Nitric oxide in the lung: therapeutic and cellular mechanisms of action. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 84, p: 401-411, 1999.

WELBOURN, C. R.B. and YOUNG, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **British Journal of Surgery**, 79, 998–1003, 1992.

WELIN, A. **Survival strategies of *Mycobacterium tuberculosis* inside the human macrophage**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Linköping University Medical Dissertations, 2011.

WHALEY-CONNELL A, PAVEY B, CHAUDHARY K. et al.: Renin-angiotensin-aldosterone system intervention in the cardiometabolic syndrome and cardio-renal protection. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, 1:27-35, 2007.

WOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of human genetics**, 19: 251-253, 1955.

WOLFF, B.; GRABE, H.; SCHLU, TERC, C.. et al. Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample. **Journal of Hypertension**, v. 23, p: 1361–1366, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. TB a Global Emergency. WHO/TB/94.177. Distr: General, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. Anuário n. 4, 2004, 79, 25–40, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control Report - WHO/HTM/TB/16, 2011.

WRIGHT, S. C., WEI, Q. S., ZHONG, J., ZHENG, H., KINDER, D. H., AND LARRICK, J. W. (1994). **J. Exp. Med.** 180, 2113-2123, 1994.

WU, L.; WANG, R. Carbon Monoxide: Endogenous Production, Physiological Functions, and Pharmacological Applications. **Pharmacol Rev.** 57:585 –630, 2005.

YAREN, A.; OZTOP, I.; TURGUT, S.; TURGUT, G.; DEGIRMENCIOGLU, S.; DEMIRPENCE, M. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphism Is Associated with Anemia in Non–Small-Cell Lung Cancer. **Experimental Biology and Medicine**, 233:32-37, 2008.

YIM, JJ.; SELVARAJ, P. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology*, v.15, n.2, pp. 241-256, ISSN 1323-7799, 2010.

YOKOYAMA K, TSUKADA T, MATSUOKA H, HARA S, YAMADA A, KAWAGUCHI Y. High accumulation of endothelial nitric oxide synthase (ecNOS): A gene polymorphism in patients with end-stage renal disease. *Nephron*; 3: 360–61, 1998.

ZAK, I.; NIEMIEC, P.; SARECKA, B.; et al. Carrier-state of D allele in ACE gene insertion/deletion polymorphism is associated with coronary artery disease, in contrast to the C677T transition in the MTHFR gene. *Acta Biochimica Polonica*. vol. 50, n. 2/2003, 527–534, 2003.

ZAKRZEWSKI-JAKUBIAK, M.; DENUS, S.; DUBÉ, M.P. et al. Ten renin-angiotensin system-related gene polymorphisms in maximally treated Canadian Caucasian patients with heart failure. *Br J Clin Pharmacol*, 65:5, 2008.

ZANCHI, A.; MOCZULSKI, D.K.; HANNA, L.S. et al. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int.* 2: 405–13, 2000.

ZHANG, Q. Z.; LIU, X. M.; ZHANG, Z. G.; WANG, L.H. et al. Analysis of the relationship between polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and lung cancer (Chinese). *Zhong Guo Fei Ai Za Zhi*, 8:211-214, 2005.

ZHANG, M.-X. et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 47, p. 16967–72, 22 nov. 2005.

ZHANG, M. et al. Effect of 27nt Small RNA on Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. v. 19, n. September, p. 3997–4005, 2008.

ZHUO, J. L.; LI, X. C. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*, 32, 1551–1565, 2011.

ZIMMERMANN, C.E.P.; DALLA LASTA, L.; COELHO, J.D. et al. **Incidência de tuberculose pulmonar em 2009, no presídio regional de Santa Maria**. 3ª Jornada Interdisciplinar em Saúde, 2009.

ZHU, X., BOUZEKRI, N., SOUTHAM, L., COOPER, R. S., ADEYEMO, A., MCKENZIE, C. A., LUKE, A., CHEN, G., ELSTON, R. C., WARD, R. Linkage and association analysis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure. *Am. J. Hum. Genet.* 68: 1139-1148, 2001.

A N E X O S

ANEXO 01

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO (A)

PARTICIPANTE:

Eu, _____,
RG _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de
maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento
poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A
professora Dra. Rubiani de Cássia Pagotto e a estudante (mestranda) bióloga Tajiana
Costa da Silva certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão
confidenciais.

Também sei que não terei nenhum gasto com a realização desta pesquisa e tão pouco
obterei qualquer vantagem financeira proveniente da minha participação voluntária. Em
caso de dúvidas poderei chamar as pesquisadoras envolvidas no projeto pelos telefones
(069) 2182-2224, (069) 8401-5961 ou, ainda, pelo e-mail rubiani@unir.br.

Declaro que me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas, e deste
modo, concordo em participar desse estudo nos termos acima dispostos.

Porto Velho, _____ de _____ de 200__

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador

Assinatura da Testemunha

ANEXO 02**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar, como voluntário da pesquisa: **ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM A TUBERCULOSE PÚLMONAR**. Após esclarecimento das informações a seguir, no caso de aceitar, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Em caso de recusa você não participará da pesquisa e não será penalizado de forma alguma.

Informações sobre a pesquisa:

Título do Projeto: ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM A TUBERCULOSE PULMONAR.

Pesquisador Responsável/Orientador: Dra. Ana Lúcia Escobar, Dra. Rubiani de Cássia Pagotto

Pesquisadora Executora: Tajiana Costa da Silva (pós-graduanda)

Contato: (69) 8401-5961, podendo entrar em contato a qualquer momento – antes, durante e após o estudo e tirar todas as suas dúvidas com os pesquisadores, mesmo em ligações a cobrar.

Objetivo desta pesquisa: Sabe-se que, durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* ocorre um aumento no nível sérico da proteína Alfa-1-Antitripsina (A1AT), diretamente relacionado com resposta imunológica ao combate da infecção. Algumas pessoas apresentam, por suas características genéticas, uma baixa produção desta proteína. No presente projeto propõe-se investigar a existência de correlação entre as características genéticas determinantes da produção de A1AT e sua influência em pacientes com tuberculose pulmonar (TB), diagnosticados no município de Porto Velho – RO.

Os procedimentos a serem adotados: Primeiramente, os pacientes serão selecionados a partir de levantamento de prontuários de pacientes com diagnóstico de TB, seguindo-se uma ordem de mais absoluto sigilo, tendo a pesquisadora executora em questão, por ordem formal assinado um termo de compromisso com as unidades de saúde, **Policlínica Oswaldo Cruz (POC), Policlínica Rafael Vaz e Silva, e Posto Municipal Maurício Bustani**, todos no município de Porto Velho-RO.

Os pacientes a serem escolhidos, não seguirão norma rígida de escolha, e ou critérios, serão analisadas as questões de acesso ao mesmo, através dos dados pessoais nos prontuários, e que sejam diagnosticados como TB positivos;

Menores terão o consentimento afirmado pelos responsáveis;

Pretende-se alcançar um quantitativo de 200 amostras;

Decorrida esta etapa, cada paciente selecionado será contatado por um dos pesquisadores envolvidos na pesquisa, ocasião na qual será informado sobre a mesma, e lhe será oferecida a oportunidade de participação no projeto, tendo todas as informações cabíveis sanadas e convidado a participar da amostra populacional a ser estudada, terá especificação em questão Após aceitação, lhe será solicitada a assinatura deste termo (TCLE), em duas vias e se efetuará a coleta da amostra de material biológico do paciente. O material biológico será coletado utilizando-se uma lanceta descartável, através de punção na região posterior da falange distal dos dedos médio ou anular (a critério do paciente), com prévia assepsia com algodão hidrófilo embebido em álcool 70%. Aproximadamente 100µL de sangue será coletado em tubo capilar heparinizado.

O capilar depois de preenchido, terá uma das extremidades seladas com massa de modelar atóxica e será armazenado em cassete, feito com pasta ondulada e identificada, esta identificação também será colocada na ficha do paciente. Deste modo, durante todos os procedimentos laboratoriais, a amostra será trabalhada de forma codificada, visando preservar a identidade do paciente.

As amostras serão coletadas nas unidades selecionadas, na qual os pacientes são tratados, e dependendo da disponibilidade dos mesmos, em suas residências. Em ambos os casos, estarão presentes os agentes de saúde, que serão parceiros junto a este projeto.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Não existe risco envolvendo a participação na pesquisa, sendo todo o material utilizado para a coleta biológica de natureza estéril e descartável. É previsto a possibilidade de apenas um desconforto manifestado por mínima sensação dolorosa local e passageira.

Como benefício, os resultados dos testes serão encaminhados via correio aos pacientes, e as unidades de saúde, com solicitação para a inclusão dos mesmos ao prontuário dos pacientes, e, caso ele seja caracterizado como “deficiente para produção da proteína”, faz-se necessário um tratamento clínico e farmacológico diferenciado.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: O presente projeto destacará como enfoque a tuberculose, e caso haja evolução e os objetivos e perspectivas sejam alcançados, o voluntário será acompanhado e encaminhado para tratamento adequado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: O voluntário será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Estará livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é

voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

Sua identidade será tratada com padrões profissionais de sigilo, sendo realizada uma codificação (Iniciais do paciente+ Iniciais do Posto de coleta+ nº coleta) que será utilizada durante toda a pesquisa. A chave para decodificação dos dados será armazenada em local seguro e ficará sob responsabilidade da pesquisadora executora do projeto. Os resultados dos exames clínicos, laboratoriais e de pesquisa lhe serão enviados e permanecerão confidenciais. Seu nome, condição clínica ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão, nem será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada pelos pesquisadores responsáveis e outra será fornecida ao voluntário.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para o voluntário e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional, nem mesmo qualquer tipo de seguro, visto que se trata apenas de um projeto de pesquisa, sem qualquer intenção de prejudicar o voluntário.

ANEXO 03**QUESTIONÁRIO PARA PESQUISA DE ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS FENÓTIPOS DA ALFA-1-ANTITRIPSINA COM A TUBERCULOSE****DADOS PESSOAIS**

- 1- Paciente nº: _____ Data: _____
- 2- Código do paciente: _____
- 3- Idade: _____ Sexo: () M () F
- 4- Etnia: () Caucasiano () Negro () Índio () Outros _____
- 5- Naturalidade: _____
- 6- Estado Civil: () casado(a) () solteiro(a) () divorciado(a) () viúvo(a)
- 7- Profissão: _____
- 8- Renda Familiar: _____
- 9- Escolaridade: _____
- 10- Endereço: _____
_____ Tel. Contato _____
- 11- Tipo de residência: _____
- 12- Saneamento: () Sim () Não – () Coleta lixo () Água tratada () Esgoto
- 13- Nº de moradores na residência: _____
- 14- Doenças Familiares: () Sim () Não _____
- Grau de Parentesco _____

ANTECEDENTES DE TUBERCULOSE

- 15- Já teve quadro diagnosticado como tuberculose
() não() sim, quanto tempo _____
- Local de atendimento _____ Família?
- 16- Qual o medicamento que fez uso? _____
- Dose: _____ Tempo de uso: _____
- 17 – Qual grau de complexidade: () baixa () média () alta
- Obs: _____

QUADRO ATUAL

- 18- Há quantos dias iniciou o quadro atual? _____

19- Faz uso freqüente de algum medicamento?

() não () sim. Quais? _____

20- Fez uso de algum medicamento desde o início do quadro atual?

() não () sim Quais? _____

21- Quadro clínico da tuberculose atual caracterizado como:

() baixa complexidade () média complexidade () alta complexidade

RESULTADOS DE EXAMES

22- Exame realizado _____ Data: _____

Resultado: _____

HISTÓRICO

23 - Foi vacinado para BCG? _____

24 - É fumante? _____ Há quanto tempo? _____

Parou? Há quanto tempo? _____

25 - É diabético _____

26 - É hipertenso _____

27 - Qual tipo de Tuberculose? _____

ANEXO 04



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
Centro Interdepartamental de Biologia
Experimental e Biotecnologia
Rubiani de Cassia Pagotto, Ph.D.

BR 364 km 9.5 (Sentido RO-AC)
CEP: 78900-000 Porto Velho (RO)
Fone (069) 2182-2134
E-mail: rubiani@unir.br

Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia

Ofício S/Nº/ CIBEI

Porto Velho, 11 de abril de 2011.


Ilmo Sr. LUCIO AUGUSTO BARAUNA

DD. Diretor Geral da Policlínica Rafael Vaz e Silva



Apresentamos em anexo proposta de projeto de pesquisa a ser desenvolvido dentro do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental (PGBIOEXP – UNIR) com o título “Estudo da Associação dos Fenótipos da Alfa-1-antitripsina com a Tuberculose pulmonar”, cujo objetivo principal é identificar fatores genéticos que podem estar influenciando na susceptibilidade de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar.

Vimos assim, por intermédio deste, solicitar de V. Sa, autorização para efetuarmos, pós-autorização do Conselho de Ética em Pesquisa de nossa Universidade, a coleta de dados nos prontuários de pacientes diagnosticados com tuberculose pulmonar e seguimento clínico nesta unidade de saúde.

Sem mais para o momento, contando com seu deferimento, agradecemos antecipadamente, renovando votos de consideração e estima.



Dr^a Rubiani de Cassia Pagotto
Prof^a Adj. Depto. Biologia-NCT-UNIR
Pesquisadora CIBEI-UNIR



12/04
11

A P E N D I C E S

SOLUÇÕES E REAGENTES

EXTRAÇÃO DE DNA:

Tampão de Lise de Eritrócitos - Lise I

Tris/HCl pH 7.6	0.01M
Sacarose	0.32M
MgCl ₂	5mM
Triton X 100	1%

PROTEINASE K- 10mg/ml H₂O

SDS 20%

NaCl 5M

Tampão A

NaCl	0.4M
EDTA	2 mM
Tris/HCl pH 8.0	10 mM
H ₂ O	qsp

TAMPÃO PARA RESSUPENSÃO DE DNA pH 8,0 - 1X - TE

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA

ELETROFORESE EM GEL:

TAMPÃO PARA CORRIDA EM ELETROFORESE/ TBE 10X, pH 8; 0,9 M

890 mM Tris
890 mM Ácido bórico
20 mM EDTA
pH 8,0

BROMETO DE ETÍDIO 10 mg/ml

Soluções e reagentes usados para eletroforese em gel de agarose (apenas quantificação)

Tampão TBE 10X;
Gel agarose 1% = 1g agarose + 100 ml de TAE ou TBE 1X;
Brometo de Etídio.

Passos a seguir:

- Aquecer a agarose com água destilada em microondas por aproximadamente 3 minutos, ou até ficar translúcido;
- Levar à cuba para resfriar;
- Colocar o “pente”;
- Após o resfriamento e solidificação do gel, adicionar tampão TAE 1X (substituível por TEB) até que um filme cubra o gel constante na cuba;
- Adicionar cuidadosamente as amostras de DNA;
- Ajustar a fonte para 80 volts por 5 minutos;
- Após 5 minutos elevar a voltagem até a desejada, aguardar aproximadamente 15 minutos.
- Desligar a fonte, retirar o gel e levar para a solução de brometo de etídio, onde o gel permanecerá cerca de 30 minutos, após isto se leva ao transiluminador para visualização.

GEL DE POLIACRILAMIDA:

Concentração	Acril. + Bisa [29:1] (ml)	Glicerol (ml)	H ₂ O (ml)	TBE 10X (ml)	TEMED (μl)	Pers. De Potássio [650mg/6,5ml] (μl)
6%	2,000	0,700	6,195	1,000	7,5	150
	4,000	1,400	12,390	2,000	15	300
7%	2,333	0,700	5,862	1,000	7,5	150
	4,667	1,400	11,723	2,000	15	300
8%	2,667	0,700	5,528	1,000	7,5	150
	5,333	1,400	11,056	2,000	15	300

Obs.: Volume total:

10 ml

20 ml

PROCEDIMENTOS:

- Lavar as placas de vidro com detergente neutro e água destilada, e com etanol 70% a parte que entra em contato com o gel, coloca-se estas para a secagem.
- Após a secagem do álcool, estas devem ser montadas em forma de sanduíche. Em seguida, coloca-se os prendedores para evitar vazamento no momento de verter o gel.
- Após a preparação do gel de poliacrilamida, a mesma deve ser vertida cuidadosamente entre as placas para evitar a formação de bolhas, após isto o pente deverá ser inserido entre as placas.
- Quando polimerizado, cerca de 30 minutos, lava-se os poços do gel com seringa para retirada do acúmulo de gel, as placas serão montadas na cuba de eletroforese (Thermo EC 120), adicionado tampão TBE 5X.

CORANDO O GEL DE POLIACRIALMIDA

SOLUÇÃO FIXADORA (NaOH 0,56 M)

{ 22,5g de NaOH (P.M. 40);
1 litro de água destilada.

SOLUÇÃO REVELADORA

{ 833 ml de água destilada;
160 ml de álcool etílico (absoluto);
7 ml de ácido acético glacial.

SOLUÇÃO NITRATO DE PRATA 0,2%

{ 2g de nitrato de prata
1L de H₂O destilada

Após corrida eletroforética o gel é fixado em 100 ml de solução fixadora por 10 minutos. Passado o tempo de incubação acrescenta-se 2ml de solução de prata, em lenta agitação durante 20 minutos. Após a fixação, o gel foi lavado sob lenta agitação em água, durante 30 segundos, e em seguida, submetido à 100 ml de solução reveladora (Na₂CO₃) + 1 ml de formaldeído, sob agitação constante, até aparecerem as bandas. A reação foi bloqueada com 100 ml de solução fixadora.